

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“EFECTO DEL EXTRACTO PROTEICO DE
MACROQUISTES DE *Sarcocystis aucheniae* SOBRE
LA VIABILIDAD Y DEGRANULACIÓN EN LOS
LEUCOCITOS DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)
in vitro”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

María del Carmen Inga Lozada

Lima - Perú

2014

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento, padres míos, Rosita y Aníbal y sobre todo a ti Dios, que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia tan maravillosa.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS – FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA, por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM, por el acceso a las instalaciones y desarrollo de mi tesis.

A mi director de tesis, M.V. Alberto Manchego Sayán , y mi asesora M.V. Kim Lam Chiok por su esfuerzo y dedicación, que con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación han logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A todas las personas buenas que cruzaron por mi camino, dejando su buen granito de arena, en muchas lecciones de vida.

INDICE

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	2
2.1.-SARCOCYSTIS.....	2
2.1.1.-Clasificación taxonómica.....	2
2.1.2.-Tipos.....	2
2.1.3.-Ciclo Biológico.....	3
2.1.4.-Características del quiste.....	5
2.1.5.-Patogenicidad.....	7
2.1.5.1.-En el hospedador intermediario.....	7
2.1.5.2.-En el hospedador definitivo.....	8
2.1.6.-Sintomatología.....	8
2.1.6.1.-En el hospedador intermediario.....	8
2.1.6.2.-En el hospedador definitivo.....	11
2.1.7.-Inmunidad.....	11
2.1.8.-Estructura antigénica.....	13
2.1.9.-Diagnóstico.....	13
2.1.9.1.-En el Hospedero definitivo.....	13

2.1.9.2.-En el Hospedero intermediario.....	13
2.1.10.-Tratamiento.....	15
2.1.11.-Prevencion y control.....	16
2.1.12.-Epidemiologia e impacto en la producción nacional.....	18
2.1.13.-Salud pública.....	19
2.2.-GRANULOCITOS.....	20
2.3.- MIELOPEROXIDASA (MPO) (EC 1.11.1.7).....	22
2.4.- N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA (NAG) (EC 3.2.1.52).....	24
2.5.-ANTICUERPOS POLICLONALES.....	27
2.6.-WESTERN BLOTTING.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1.-Lugar de estudio.....	29
3.2.-Material biológico.....	29
3.3.-Obtención de muestras.....	29
3.3.1.-Extracto proteico de macroquistes de <i>Sarcocystis aucheniae</i>	29
3.3.1.1.-Obtención de macroquistes.....	29
3.3.1.2.-Preparación del extracto de macroquistes.....	29
3.3.2.-Cultivo de leucocitos de conejo.....	30
3.4.-Procedimiento.....	31
3.4.1.-Efecto sobre la viabilidad.....	31
3.4.2.-Efecto sobre la degranulación de leucocitos.....	32
3.4.2.1.-Precipitacion de proteínas.....	32
3.4.2.2.-Electroforesis de muestras de proteínas.....	32
3.4.2.3.-Transferencia de las proteínas a la membrana.....	34

3.4.2.4.-Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos.....	36
3.4.2.5.- Adición de anticuerpos primarios y secundarios.....	36
3.4.2.6.-Revelado.....	37
IV. RESULTADOS.....	38
4.1.-Efecto sobre la viabilidad leucocitaria.....	38
4.2.-Efecto sobre la degranulación de leucocitos.....	41
V. DISCUSIÓN.....	44
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	49

RESUMEN

Los macroquistes de *S. aucheniae* producen cuadros de intoxicación alimentaria muy variada en humanos y los conejos son altamente susceptibles cuando se le inyecta extractos proteicos intramuscularmente. Esta susceptibilidad variada por especies filogenéticas distintas podrían deberse a los receptores celulares para las endotoxinas de los macroquistes. En el presente trabajo se buscó determinar el efecto tóxico del extracto proteico de macroquistes de *S. aucheniae* sobre leucocitos circulantes de conejo (citotoxicidad) *in vitro*. Se expusieron diversas concentraciones de extracto proteico (0.5, 1, 50, 500, 1000 ng/100µl) a una población de 500 000 leucocitos/ml por 1 y 12 horas mantenidos en un medio de cultivo a un ambiente de 37°C, midiéndose la viabilidad celular por exclusión con azul de tripán y la degranulación de enzimas leucocitarias (Mieloperoxidasa y Glucosaminidasa) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nitrocelulosa (Western Blotting). Sobre los tratamientos, el recuento de células a la hora de incubación demostró que existe mortalidad alta entre 57.7% y 58.1% y a las 12 horas fue de 65.2% y 99.4% en todos los grupos de tratamiento (desde 0.5 hasta 1000ng/100µl de antígeno), observándose que no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre las medias del número de leucocitos que sobreviven a cada tratamiento. La mortalidad en el grupo control de suero fisiológico alcanza 5% y 57% a 1 y 12 horas de incubación respectivamente. Sobre la degranulación de leucocitos, se observa que existe secreción de proteínas diferentes a las observadas en el control inoculado con suero fisiológico en los tratamientos evidenciado por la tinción de bandas en las membranas de transferencia. Se concluye que el extracto proteico de macroquistes de *S. aucheniae* es altamente citotóxico para los leucocitos de conejo y se observa la secreción de proteínas.

Palabras claves: *Sarcocystis aucheniae*, Mieloperoxidasa, Glucosaminidasa, conejos.

ABSTRACT

The macrocysts of *S. aucheniae* produce states of varied food poisoning in humans and rabbits are highly susceptible when injected intramuscularly protein extracts. This susceptibility varied for different phylogenetic species might be due to cellular receptors for the macrocysts endotoxins. In this study sought to determine the toxic effect of protein extract of *S. aucheniae* macrocysts on circulating leukocytes rabbit (cytotoxicity) *in vitro*. Various concentrations of protein extract (0.5, 1, 50, 500, 1000 ng / 100 µl) to a population of 500 000 cells / ml were exposed for 1 to 12 hours maintained in a culture medium to an atmosphere of 37 ° C, measuring the viability cell by trypan blue exclusion and leukocyte degranulation enzymes (Myeloperoxidase and glucosaminidase) by polyacrylamide gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose membranes (Western blotting) . On treatments , the cell count when incubation showed that there is high mortality among 57.7 % and 58.1 % and after 12 hours was 65.2 % and 99.4 % in all treatment groups (from 0.5 to 1000ng / 100l antigen) , showing that there is no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the mean number of leukocytes that survive each treatment. Mortality in the control group reached saline 5% and 57% at 1 and 12 hours incubation respectively. On leukocyte degranulation, shows that there secretion different from those observed in the inoculated in saline treatments evidenced by staining bands in controlling protein transfer membranes. Conclude that the protein extract of *S. aucheniae* macrocysts is highly cytotoxic to rabbit leukocytes and protein secretion is observed.

Keywords: *Sarcocystis aucheniae*, Myeloperoxidase, glucosaminidase, rabbits.

LISTA DE CUADROS

Cuadro N°1: Nomenclatura de las diluciones de la muestra humana de sangre.

Cuadro N°2: Nomenclatura de las diluciones del concentrado de macroquistes de *S.aucheniae*

Cuadro N°3: Resultado de la incubación de las diferentes concentraciones del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* .a los leucocitos de conejo durante una hora.

Cuadro N°4: Resultado de la incubación de las diferentes concentraciones del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* a los leucocitos de conejo durante doce horas..

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1: Porcentaje de mortalidad leucocitaria a la primera hora de exposición al extracto proteico de *Sarcocystis aucheniae*.

Gráfico 2: Porcentaje de mortalidad leucocitaria a las 12 horas de exposición al extracto proteico de *Sarcocystis aucheniae*.

Gráfico 3: Porcentaje de mortalidad leucocitaria a la primera hora vs. 12 horas de exposición al extracto proteico de *Sarcocystis aucheniae*.

Figura 1. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomasie del sobrenadante de cada tratamiento en comparación con el plasma de conejo.

Figura 2.A Gel de Electroforesis de cada tratamiento tenido con Azul de Coomassie.

Figura 2.B Western blotting de las proteínas halladas de cada tratamiento en los geles de electroforesis

LISTA DE ABREVIATURAS

Acs	Anticuerpos
Ags	Antígenos
CXCL8	Péptido Activador de Neutrófilo Linfocito Derivado
CSA	Camélidos Sudamericanos
°C	Grados Celsius
EITB	Electro Inmuno Transferencia Blot
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IgA	Inmunoglobulina A
kDa	Kilo Daltons
Kg	Kilogramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
µm	Micrometros
µg	Microgramos
mg	Miligramos
µl	Microlitros
ng	Nanogramos
PPP	Periodo prepatente
PP	Periodo patente
p.i.	Post-infección
%	Porcentaje
Rpm	Revoluciones por minutos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú el *Sarcocystis aucheniae* causa infecciones importantes en alpacas y llamas (Guerrero, 1967), causando problemas sanitarios en la producción alpaquera del Perú y el mundo. Desde el punto de vista veterinario los estadios de desarrollo del parásito de importancia se encuentran en los hospedadores intermediarios (Urquhart *et al.*, 1996). Sin embargo desde el punto de vista en salud pública; es una enfermedad importante no solo porque el hombre puede actuar como hospedador definitivo de dos especies: *S. bovi hominis* y *S. sui hominis* sino además se considera como una zoonosis tóxica; debido a que se han reportado evidencias de trastornos gastroentéricos en personas que consumieron carne insuficientemente cocida, infectada con *S. aucheniae* (Leguía, 1989) y con *S. bovi hominis* (Hiepe *et al.*, 1979). Además, estos cuadros son ampliamente conocidos por los campesinos de las zonas altoandinas de nuestro país y son atribuidos a la “frescura de la carne” (Leguía, 1991). Los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* producen cuadros de intoxicación alimentaria muy variada en humanos. Los conejos son altamente susceptibles cuando se le inyecta extractos proteicos intramuscularmente, pero es menos severo en ratones (Sam, 1998). Los quistes de *Sarcocystis* tienen en su interior una sustancia proteica, denominada sarcocistina, la cual tiene una actividad neurotóxica que fue demostrada por Hiepe *et al.*, en 1981. La sarcocistina, es considerada como una endotoxina que actúa a nivel del músculo cardiaco y tejido nervioso gastrointestinal (Briggs y Foreyt, 1985). Esta variada susceptibilidad del curso de la intoxicación en diversas especies y las lesiones que se observan en ellas, indica la acción neurotóxica de las toxinas, pero también la posible participación de células leucocitarias productoras de citoquinas pro-inflamatorias y contenidos lisosomales (degranulación); por lo que la fisiopatología de estas intoxicaciones no está bien establecida, debiéndose establecer el grado de participación del sistema inmune en estos cuadros. La susceptibilidad de los conejos, lo hacen un modelo animal para investigar la fisiopatología de las intoxicaciones por proteínas del *S. aucheniae*. Identificando los factores que intervienen en la fisiopatología de las intoxicaciones, permitirán adecuar medidas terapéuticas para tratamiento y control de las mismas. Se hipotetiza que la exposición de los leucocitos de conejo a las proteínas contenidas en el extracto de macroquistes de *S. aucheniae*, provoca citotoxicidad y su degranulación. Es por eso que el presente trabajo tuvo como objetivos cuantificar el nivel citotóxico del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* en los leucocitos de conejo e identificar la presencia de sustancias de degranulación provenientes de los leucocitos al ser enfrentados al extracto de macroquistes de *S. aucheniae*.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1.-SARCOCYSTIS

2.1.1.-Clasificación taxonómica

Levine (1986) hace referencia de los siguientes autores que proponen la siguiente clasificación taxonómica:

Phylum **APICOMPLEXA** Levine, 1970
Clase **SPOROZOASIDA** Leuckart, 1879
Subclase **COCCIDIASINA** Leuckart, 1879
Orden **EUCOCCIDIORIDA** Léger y Duboscq, 1910
Suborden **EIMERIORINA** Léger, 1911
Familia **SARCOCYSTIDAE** Poche, 1913
Subfamilia **SARCOCYSTINAE** Poche, 1913
Género **SARCOCYSTIS** Lankaster, 1882

2.1.2.-Tipos

El género *Sarcocystis* incluye especies altamente patógenas, productora de sarcocistiosis, para bovinos (Uggla, 1990), cerdos (Perovic, 1991), ovinos, camellos (Hilali y Nassar, 1992), caballos (Gunn y Frher, 1992), cabras (Kudi y Aganga, 1991), incluyendo animales silvestres como tejones, ratas, búfalos y monos, entre otros (Khan y Fong, 1991).

En los camélidos sudamericanos, la sarcocistiosis es causada por la infección de *Sarcocystis aucheniae* y *Sarcocystis lamacanis*, ambos de ciclo de vida indirecto del tipo predador-presa (Leguía y Casas, 1999).

En camélidos sudamericanos se han reportado tres especies de *Sarcocystis*: *S. tilopodi* (sin. *S. guanicoecanis*) en guanacos (Quiroga *et al.*, 1969; Gorman *et al.*, 1984), el *S. aucheniae* en alpacas llamas y vicuñas (Guerrero y col., 1967) .Ambos producen quistes macroscópicos de crecimiento y maduración lenta en la musculatura esquelética y el *S.*

lamacanis propuesto por Leguía *et al.*, (1989) en alpacas, que forman quistes microscópicos infectivos en corto tiempo, en la musculatura miocárdica y esquelética.

2.1.3.-Ciclo Biológico

Los miembros de este género son protozoos intracelulares obligatorios, y, como toda coccidia, su ciclo de vida consiste en merogonia, gametogonia y esporogonia (Tenter, 1995). El *Sarcocystis* spp., es de ciclo indirecto, requiere de dos hospedadores obligatorios en donde se desarrollan el estadio sexual (predador, hospedador definitivo) y el estadio asexual (presa, hospedador intermediario) (Leguía *et al.*, 1989).

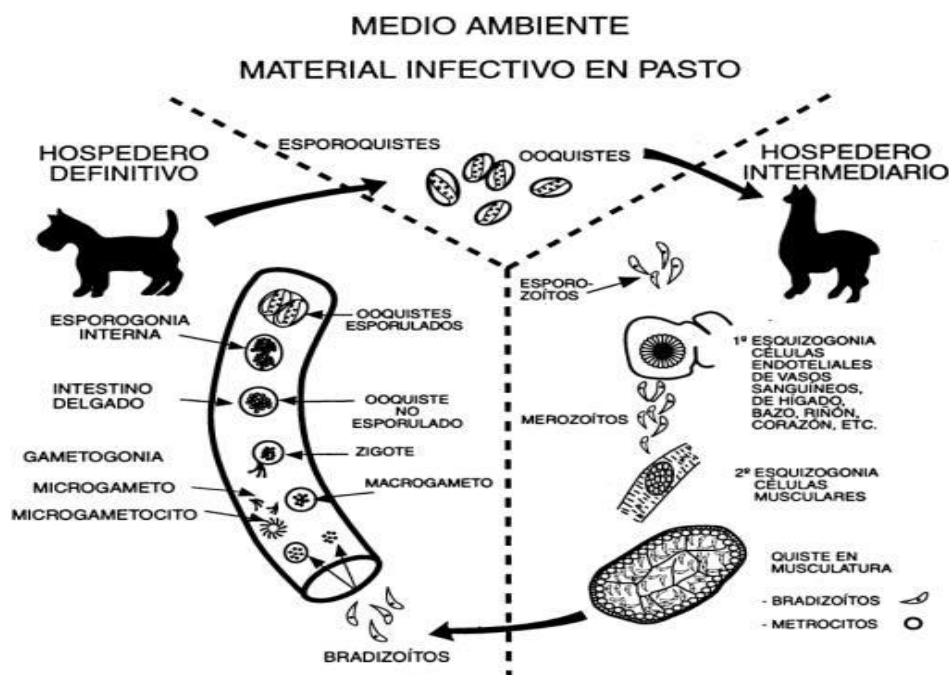
La alpaca es el hospedero intermediario donde el parásito realiza su reproducción asexual, formando los macro y micro quistes que pueden afectar en forma masiva las fibras musculares, tanto estriadas como cardíacas (Guerrero y Leguía, 1987). El hospedero definitivo es el canino doméstico y silvestre, donde las coccidias desarrollan su fase sexual dando lugar a la formación de miles de esporoquistes y ooquistes, los mismos que salen esporulados junto con las heces al medio ambiente (Guerrero y Leguía, 1987). El hombre, gato y felinos silvestres, hasta donde se conoce, no transmiten la enfermedad (Leguía *et al.*, 1989).

El hospedador definitivo se infecta al alimentarse de un animal (presa) o carne infectada con sarcoquistes: los bradizoítos son liberados por la digestión en el estómago e intestino del predador, éstos se mueven activamente e ingresan a la pared intestinal donde se dividen en gametos (femenino y masculino) produciéndose luego la fecundación y dando como resultado los ooquistes (zigotes). El ooquiste, al poseer una membrana muy frágil, esporula en la lámina propia del intestino, cada ooquiste contiene dos esporoquistes y cada uno de éstos tiene cuatro esporozoítos. El esporoquiste, es evacuado al exterior junto con las heces (Levine, 1986; Soulsby, 1987; Dubey y col., 1989; Rojas, 1990; Mehlhorn, 1993).

El parásito vive y se reproduce sexualmente en el intestino del perro y elimina grandes cantidades de esporoquistes en las heces dependiendo de la especie de *Sarcocystis* de camélido y de la evolución de la infección en el perro. La eliminación continúa por un período de 4 a 8 semanas, luego de la cual se produce la recuperación espontánea (White, 1998).

El hospedador intermediario adquiere la infección al ingerir alimentos (pasturas) o aguas contaminadas con los esporoquistes, liberándose los esporozoítos en el intestino para luego entrar a la circulación sanguínea y desarrollar la primera generación de esquizonte en las células endoteliales o subendoteliales de los vasos sanguíneos de casi todos los órganos. Los merozoítos producidos en la primera generación de esquizontes entran a nuevas células endoteliales y subendoteliales donde se realiza la segunda generación de esquizontes. La segunda generación de merozoítos entra a las células musculares esqueléticas, cardíacas y algunas veces también en las células del sistema nervioso central donde se realiza la tercera generación de esquizontes, la que finalmente termina conformando el quiste (sarcoquistes) que pueden ser microquistes y/o macroquistes, en cuyo interior se forman los bradizoítos o cistozoítos. Con la ingestión del sarcoquiste del predador, se cierra el ciclo. (Levine, 1986; Soulsby, 1987; Dubey *et al.*, 1989; Rojas, 1990; Mehlhorn, 1993).

En camélidos, por lo menos una especie de *Sarcocystis* produce quistes microscópicos (*S. lamarcanis*), y otra (*S. aucheniae*) produce quistes macroscópicos. En infecciones naturales, es común que ambas especies afecten al hospedador intermediario simultáneamente (White, 1998).



CICLO BIOLÓGICO DEL *Sarcocystis* (Leguía, 1999).

2.1.4.-Características del quiste:

Los microquistes se ubican generalmente en corazón y diafragma del hospedador intermediario así como también en el músculo esquelético. Los macroquistes, se caracterizan por ser de color blanco y del tamaño de un grano de arroz siendo pequeños y compactos, ubicándose generalmente en el esófago y cuello, así como también en cualquier parte del músculo esquelético pero nunca en el corazón (White, 1998). Estos quistes (macro o micro) no ocasionan reacción inflamatoria alguna mientras se encuentran en el músculo, pero a medida que la concentración de quistes aumenta, éstos pueden interferir con la eficiencia muscular (White, 1998) y atentan contra la salud del animal (Sam, 1988, La Perle *et al.*, 1999) con la consecuente disminución de la producción y productividad de los animales, además condiciona la pérdida del valor comercial de las canales, por su decomiso en el camal (Alva *et al.*, 1980) y por el rechazo de la carne en los mercados (Concha, 1999).

En un estudio realizado por Cornejo en el 2007 tuvo el objetivo de determinar si el tamaño de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* afectan la viabilidad y potencial biótico en los caninos domésticos, se utilizaron 24 cachorros cruzados de 2.5 meses de edad, con pesos promedio de 2.6 kg., debidamente desparasitados y alimentados con una dieta casera exenta de carnes. Se obtuvo macrosquistes de *S. aucheniae* del cuello de alpacas y llamas, clasificándolos en macroquistes grandes (>5 mm) y pequeños (1-3 mm). Diez cachorros fueron oralmente infectados con 500 macroquistes grandes (MG) y 12 cachorros con 500 macroquistes pequeños (MP), en ambos casos por dos días consecutivos. Además, 6 perros quedaron sin infectar como grupo control. Se recolectó diariamente muestras fecales a partir del 8º día post-infección y por un periodo de 22 días. Los resultados mostraron que animales infectados con MP presentaron una carga de esporoquistes 3.6 veces superior que aquellos infectados con MG; así mismo, el periodo prepatente promedio fue de 16.5 y 11.5 para los MG y MP, respectivamente.

Los microquistes del músculo cardíaco de alpacas y llamas, mostraron resistencia a la acción de la tripsina. Se diferenciaron dos tipos de microquistes, unos fusiformes y otros elípticos con dimensiones entre 38.68 x 19.83 µm y 252.39 x 39.67 µm. Los cistozoitos miden aproximadamente 10-11µm x 3-3.5µm y están dentro del quiste y son de forma ameboidea y otro de forma redondeada, y aparece en forma semilunar, presentando un polo afilado (conoide) y el otro ligeramente redondeado; con una mayor aproximación se pueden distinguir las fibrillas de las células sarcosporídicas que están dispuestas en forma longitudinal al parásito hasta llegar

al conoide, ambos tipos celulares están en proceso de división. Consideran que estos cistozoitos son células progenitoras o metrocitos que dan origen a bradizoitos. Los quistes estudiados de animales infectados en forma natural presentan formas ovoides y fusiformes, midiendo entre 0.1 y 1 cm. de largo. Los quistes ovoides tienen una pared primaria gruesa con protrusiones en forma de «Coliflor», mientras que los quistes fusiformes, presentan una pared con protrusiones en forma de papilas (lengüetas) (Melo, 1992). El quiste genera una miositis eosinofílica diseminada asociada a macroquistes. El tamaño de los macroquistes varía, así como el espesor de la pared quística (Jensen, 1986).

Los quistes están formados por una doble pared, una externa que generalmente presenta protrusiones llamadas vellosidades o papilas cuya diversidad morfológica ayuda a diferenciar las especies de *Sarcocystis* y una pared interna de donde parten prolongaciones hacia el interior del quiste formando cavidades multiloculares donde se encuentran los bradizoítos (Melo, 1974). Además, las paredes quísticas están compuestas por vellosidades anastomosadas (La Perle *et al.*, 1999). Estos quistes destacan en el músculo esquelético como formaciones esféricas y ovaladas de color blanco nacarado, de consistencia blanda y con dimensiones variables desde escasos milímetros hasta más de un centímetro, con apariencia de granos de arroz. Observados con microscopio óptico, los quistes presentan una pared quística radiada (Guerreo *et al.*, 1967).

Por otro lado, se cree que dentro del quiste de los *Sarcocystis* spp existe una sustancia tóxica llamada Sarcocystina, dotada de propiedades antigénicas, esta sustancia es una poderosa neurotoxina (Hiepe *et al.*, 1981). Los quistes ubicados en la musculatura liberan la toxina al romperse, pasando la toxina al torrente sanguíneo y así se propaga por todo el organismo, lo que producirá, entre otras lesiones abortos en el ganado daño a nivel cardíaco, hepático, y en otros órganos. En muchos casos llega a ser letal (Sam *et al.*, 1998).

La toxina tiene características hemolíticas y hemoaglutinantes, así como propiedades neuromusculares. Actúa luego que los sarcopodios invaden el epitelio intestinal, se albergan provisionalmente en el hígado y en el bazo y llegan a la musculatura con el torrente sanguíneo. Tras la muerte de los sarcopodios, la sarcocystina liberada desarrolla su acción tóxica - degenerativa sobre el tejido circundante, que produce la calcificación del parásito y de la estructura que lo rodea (Martínez *et al.*, 1999). La potencia de esta sustancia tóxica varía entre diferentes especies del parásito, e incluso algunas especies de hospederos son resistentes al efecto tóxico (Hiepe *et al.*, 1981).

2.1.5.-Patogenicidad

2.1.5.1.-En el hospedador intermediario

La patogenicidad del *Sarcocystis* fue considerada por muchos como incierta, hasta que se realizaron diversos estudios con el cual se pudo determinar su ciclo de vida y además la patogenicidad causada en diversos animales. Donde se ha demostrado que causa destrucción masiva del endotelio vascular de capilares y arteriolas de casi todos los órganos del animal, como consecuencia de la reproducción asexual del parásito (Leguía y Casas, 1999).

Se reconoce que, los sarcoquistes se encuentran adaptados en músculo y sistema nervioso central, sin aparente reacción del animal infectado. Se presume la ruptura de algunos sarcoquistes en algún momento de la infección con probable liberación de productos tóxicos, no existiendo claridad sobre el rol que juega en los procesos de sarcocistiosis crónica (Tadros y Laarman, 1982). Los quistes de *Sarcocystis* tienen en su interior una sustancia proteica la cual tiene una actividad neurotóxica que fue demostrada por Hiepe *et al.*, en 1981, denominándola Sarcocystina, considerada como una endotoxina que actúa a nivel del músculo cardíaco y tejido nervioso gastrointestinal (Briggs y Foreyt, 1985). Sam (1988), realizó la caracterización parcial de los componentes antigénicos de lisados de bradizoítos de macro y microquistes de *S. aucheniae* reportando el hallazgo de proteínas con capacidad antigénica, determinando una reacción inmunológica cruzada entre ellos, al enfrentarlos a sueros homólogos y heterólogos producidos en conejo. Además demostró su acción letal en estos a las 12 horas post inoculación.

Años posteriores a este estudio se realizó uno complementario con lisado de macroquistes de *S. aucheniae* que fue inoculado a un grupo de 12 conejos, 44 ratones y 2 cobayos con el objetivo de evaluar su actividad biológica. En donde el lisado consistió en 15 péptidos con actividad electroforética entre 25 a 127 kDa. Las manifestaciones clínicas y la acción letal en conejos fue dependiente a la dosis que fue administrada de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 µg de proteína por gramo de peso vivo. Los signos clínicos que presentaron consistieron en postración, disnea, pupila contraída, hipertermia y diarrea. Al examen histopatológico observaron alteraciones en diferentes órganos, siendo el pulmón el más afectado, mostrando severa hiperemia y neumonitis. En los riñones, observaron congestión glomerular y trastornos degenerativos del epitelio tubular. En el hígado se observó congestión de vasos portales y sinusoides hepáticos; así como, degeneración e hiperplasia de hepatocitos. El miocardio presentó alteraciones hemodinámicas similares a las descritas anteriormente.

Todos los conejos murieron entre las 5 y 23 horas post inoculación. Los cobayos y ratones inoculados no mostraron signos clínicos hasta los 2 y 8 días post inoculación, respectivamente. Los resultados evidenciaron la presencia de péptidos en el lisado de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* de acción tóxica letal para conejos, dependiente de la dosis administrada y de la resistencia al efecto tóxico en ratones y cobayos (Sam, 1998).

2.1.6.2.-En el hospedador Definitivo

Se ha demostrado experimentalmente, que los microquistes (*S. lamacanis*) pueden ser altamente patógenos en los perros. Así, un cachorro presentó a los 10 días p.i., signos clínicos caracterizados por anorexia, pirexia (41°C), palidez de las membranas mucosas, diarrea muco sanguinolenta, incoordinación y postración, muriendo dos días después. A la necropsia se observó contenido biliar en la mucosa del yeyuno e ilion, hiperémica, edematosa y congestionada, además de hemorragias longitudinales en mucosa del colon.

Los otros cachorros del mismo estudio, presentaron una ligera diarrea mucosa entre los días 9-14 p.i. Por otro lado, los perros inoculados con macroquistes (*S. aucheniae*) sin precisiones de tamaño presentaron una diarrea mucosa (Leguía *et al.*, 1989). Alva *et al.* 1981 y Schneider *et al.* 1984, reportan la infección de perros con quistes macroscópicos de alpacas y llamas respectivamente.

2.1.6.-Sintomatología

2.1.6.1.-En el hospedador intermediario

La sintomatología clínica de la enfermedad se puede dividir en sobreaguda, aguda y crónica (Dubey *et al.*, 1989). Los signos clínicos de la fase sobreaguda no son muy evidentes, caracterizados principalmente por fiebre recurrente que coincide con la parasitemia o fase proliferativa y leve lesión orgánica (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Radostis *et al.*, 2002).

La fase aguda de la enfermedad es considerada la más peligrosa, al ser dependiente de la cantidad de esporoquistes ingeridos (Leguía y Clavo, 1989) y la edad del animal (Castro *et al.*, 2004), presentando fiebre salivación, anemia, anorexia, disminución de la ganancia de peso, pérdida de peso, aborto, postración y muerte generalmente 20 a 30 días después de la infección. Estos síntomas se producen cuando el parásito en su fase de segunda generación de esquizontes sale al torrente sanguíneo, destruyendo muchas células del endotelio vascular (arterias),

provocando múltiples hemorragias en diferentes órganos del cuerpo (Sam, 1988; Dubey *et al.*, 1989; Leguía y Clavo, 1989).

Muchas de las especies patógenas de *Sarcocystis* causan enfermedad aguda solo en su hospedador intermediario, pero no en el hospedador definitivo. En los hospedadores intermediarios, la enfermedad aguda es causada principalmente en las fases iniciales de la merogonia, la cual es llevada a cabo en las células endoteliales de casi todos los órganos internos y la enfermedad crónica es causada en la última fase de la infección. La severidad de los signos clínicos depende de la dosis de esporoquistes ingeridos y del estado inmune del hospedador. Sin embargo, no hay signos clínicos específicos para Sarcocistiosis (Dubey *et al.*, 1989; Tenter, 1995).

Con la finalidad de determinar el cuadro patológico de la fase aguda producido por *Sarcocystis lamaricani* tres alpacas de 4 meses de edad, libres de parásitos, fueron inoculadas oralmente con 16,000 esporoquistes procedentes de heces de perros infectados con músculo cardíaco con microquistes (*Sarcocystis lamaricani*). Produciendo ellas un cuadro clínico agudo entre los 19 y 21 días p.i. Este cuadro clínico se caracterizó por: anorexia, pirexia, pérdida de peso, salivación, disnea, palidez de las mucosas, incoordinación, postración y muerte entre 3 a 4 días después. A la necropsia se hallaron hemorragias equimóticas de moderadas a severas, en serosas del tracto gastrointestinal, órganos torácicos, abdominales y sistema nervioso central; observándose además, hidrotórax, hidropericardio, hidroperitoneo y necrosis de tipo zenkeriana asociada con hemorragias focalizadas a difusas en la musculatura esquelética y cardíaca. Es posible que las sustancias relacionadas con *Sarcocystis* simulen la producción del TNF y se sabe también que el TNF está asociado con la producción de líquidos en el organismo (Dubey *et al.*, 1989).

Los cambios histopatológicos observados fueron: congestión severa y hemorragias en los tejidos afectados, asociados con la presencia de esquizontes en el endotelio vascular e infiltración moderada a severa de células linfocíticas. También se halló la presencia de quistes inmaduros de *Sarcocystis* en la musculatura cardíaca y esquelética, acompañada con severa hemorragia, degeneración y/o necrosis neural o de células de Purkinje (Sam, 1988).

Investigaciones realizadas en terneros a los cuales se les infectó experimentalmente con ooquistes de *Sarcocystis cruzi*, permitieron determinar los signos clínicos: anorexia, pirexia y caquexia; y observar que luego les ocasiona la muerte (33 días p.i.). A la necropsia se observó linfadenopatía generalizada y petequias en membranas serosas. Así como, fueron hallados

esquizontes en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fayer y Johnson, 1973). Estos signos clínicos y los hallazgos a la necropsia, fueron similares a los reportados para la enfermedad de Dalmeny en vacas en Canadá (Dubey, 1976).

Se han reportado casos de enfermedad clínica aguda en diferentes especies de animales. Así por ejemplo, en ovinos (*Sarcocystis tenella*) (Dubey *et al.*, 1989); bovinos (*Sarcocystis cruzi*) (Carrigan, 1986); caballos (*Sarcocystis neurona*) (Dubey *et al.*, 1991a) perros (*Sarcocystis canis*) (Dubey *et al.*, 1991b); cacatúas cockatiles y loros africanos (*Sarcocystis falcatula*) (Clubb *et al.*, 1992); el hombre (*Sarcocystis hominis*, *Sarcocystis sui hominis*) (Tello, 2000); osos polares en cautiverio (*Sarcocystis* sp.) (Garner *et al.*, 1997); mapaches (*Sarcocystis neurona*) (Hamir *et al.*, 2001), etc.

La fase crónica no tiene signos clínicos visibles, se manifiesta cuando la alpaca consume pequeñas cantidades de esporoquistes durante un largo tiempo, por esta razón es que se ha creado la errónea idea en el ganadero de que sarcocistiosis no ocasiona enfermedad, ya que el animal si está sufriendo pequeñas hemorragias internas y se manifiesta con retardo en su desarrollo, no engordan presentan fatiga, dificultad para respirar después de caminatas normales (Leguía y Clavo, 1989 ; Ramírez *et al.*, 1998).

Esta fase se relaciona con la presencia de quistes como granos de arroz, blanquecino, en la musculatura esquelética y cardíaca y no se debe olvidar que el *Sarcocystis* continúa dividiéndose con un metabolismo bastante alto (Leguía *et al.*, 1990) además cuanto más adulto se sacrifica a la alpaca o llama, la carne se encontrara severamente invadida por quistes. Se presume que los signos de la fase crónica se deban a la presencia de la toxina (sarcocystina) en la sangre, que es mortal para conejos (Sam *et al.*, 1998).

Nakamura *et al.*, (1999) demostraron en un estudio que el extracto quístico de *Sarcocystis cruzi* era un potente inductor del TNF- α en conejos. Esta sustancia es producida por macrófagos, estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria. Está relacionado con los glóbulos blancos de la sangre, endotelio y otros tejidos en transcurso de distintas agresiones celulares. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares Interleucina-1 y endotoxinas.

TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando activación de linfocitos T y B (Dubey *et al.*, 1989).

En los Estados Unidos, se reportó un caso clínico de *Sarcocystis* en una alpaca hembra importada de 6 años de edad. La que se describe con una miositis eosinofílica diseminada, asociada con macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, éstos fueron caracterizados histopatológicamente por compartimentos segmentados conteniendo bradizoítos y estructuralmente o en paredes quísticas compuesto de vellosidades anastomosadas. Dos horas antes de su muerte, la alpaca abortó un feto de 8 meses de gestación, pero no se hallaron lesiones en el útero, placenta o feto. Hallazgos macroscópicos adicionales incluyen hemorragias en cavidad abdominal, hemorragias en miofibrillas, degeneración y necrosis. La probable causa de sarcocistiosis en este caso fue debido a *Sarcocystis aucheniae* (La Perle *et al.*, 1999).

2.1.6.2.-En el hospedador definitivo

Leguía y Casas (1999) afirman que el *Sarcocystis* sp puede producir una enfermedad grave en perros después del consumo de carne masivamente infectada con quistes, presentando un cuadro con fiebre, falta de apetito, anemia, diarrea sanguinolenta, debilidad, tembladera, postración y muerte.

En personas voluntarias, después de la ingestión de carne de cerdo infectada con *S. suis hominis*, se observó vómitos, diarreas, sudoración y escalofríos, empezando de 6 a 24 horas luego del consumo y continuaron por 12 a 24 horas después. Los esporoquistes fueron eliminados entre 11 y 71 días luego de la ingesta. El consumo de carne de vacuno infectada con *S. bovis hominis* fue seguido por malestar abdominal y en algunos voluntarios, por náuseas y diarreas; los esporoquistes se eliminaron entre 13 y 39 días después de la ingestión y continuaron por 9 a 179 días. La enteritis eosinofílica y enteritis obstructiva ulcerativa pueden ser complicaciones ocasionales (Frenkel, 2000).

2.1.7.-Inmunidad

Los parásitos son específicos y están adaptados a su huésped definitivo. Ellos evolucionan de menos a más comodidad en sus huéspedes, desde que las defensas específicas aparecen. Un mismo parásito tiene la posibilidad de pasar por varias especies de animales, en

donde va a tener un efecto patógeno y una respuesta inmune de acuerdo con el grado de adaptación a ese huésped. Los factores de esta resistencia no son inmunológicos, ya que otras causas intervienen, quizás un sistema enzimático, antígenos de superficie, etc. (Quiroz 2005)

La respuesta inmune en el hospedero intermediario que se desarrolla frente a los protozoos es similar a la que se desencadena en bacterias. Donde los antígenos protectores están asociados con la formación de fases sexuales; la expresión de la inmunidad depende de la actividad de las células T las cuales colaboran con la producción de anticuerpos neutralizantes contra los esporozoítos así como también la liberación de linfocinas que tratan de inhibir la multiplicación de las fases intracelulares; tratando de conseguir la disminución de los síntomas clínicos y la reducción del número de ooquistes (Urquhart *et al.*, 2001).

Como podría suponerse de un parásito intracelular, la inmunidad celular es movilizadora durante la infección por *Sarcocystis*. Se ha observado infiltración celular en los tejidos viscerales y musculares afectados, siendo esta infiltración en su mayoría macrófagos y linfocitos. Esta infiltración puede permanecer por largo tiempo (Dubey, 1986; Sam, 1988; Leguía, 1990).

No solo en los tejidos viscerales afectados se ha demostrado una respuesta celular. Se han demostrado linfocitos específicos a *Sarcocystis* en la circulación periférica de los bovinos dentro de los 15 días p.i., pero su actividad decrece rápidamente. Por otro lado, en los ovinos la actividad de los linfocitos no fue evidente hasta la tercera y cuarta semana luego de la inoculación, pero su actividad permaneció por más de cinco y seis meses. Esta respuesta coincide con la liberación de la primera generación de merozoítos en bovinos y ovinos (Gasbarre, 1984).

La respuesta humoral en los animales domésticos ha sido estudiada en animales inoculados con *Sarcocystis*. Así por ejemplo, bovinos inoculados con *Sarcocystis cruzi* desarrollaron IgM a la tercera y cuarta semana p.i. y retoma a niveles de preinfección a los 2 a 3 meses; y la respuesta de IgG1 se incrementó a la quinta y sexta semanas post infección, permaneciendo altas por más de 5 a 6 meses. En los ovinos (inoculados con *Sarcocystis ovicanis*) los anticuerpos IgG1 tuvieron un curso similar a lo observado en los bovinos, excepto que los incrementos se presentaron ligeramente más tarde (entre la sexta y octava semana p.i.). No se observó respuesta de IgM cuantificable en ovinos. Anticuerpos IgA e IgG2 no fueron detectados en bovinos ni en ovinos (Gasbarre, 1984).

2.1.8.-Estructura antigénica

Los antígenos parasitarios han sido caracterizados, por los diferentes métodos de difusión en gel, electroforesis y técnicas enzimáticas, estando constituidos por proteínas (exclusivamente polipéptidos), poliósidos, glicoproteínas y de lipoproteínas (Quiroz, 2005).

Los componentes antigénicos del *Sarcocystis aucheniae* fueron caracterizados parcialmente mediante la separación electroforética en el gel SDS poliacrilamida al 10%, que reveló la existencia de 9 polipéptidos en el rango de 13 KDa a 124 KDa para el lisado de macroquistes. Estas proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa reaccionaron frente a los sueros anti *Sarcocystis* (Sam, 1988).

La diversidad de formas evolutivas que se desarrollan en el transcurso de la infección, contiene diferentes tipos de proteínas antigénicas, cuyos pesos moleculares difieren tanto en función de la especie como de la forma parasitaria. Es por eso que la detección de anticuerpos circulantes, así como su concentración y evolución, son valores variables, dependientes de la técnica empleada como también de la fuente de antígeno (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

En un trabajo realizado por Sam *et al.*, (1996) encontraron 15 bandas proteicas entre 25 a 127 kDa para lisados de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, en gel SDS PAGE al 15%. Sin embargo, Cabrera (1996) encuentra 7 bandas proteicas de importancia localizadas entre 190 a 33.5 kDa de peso molecular.

2.1.9.-Diagnóstico

2.1.9.1.-En el Hospedero definitivo: El examen coproparasitológico sirve de gran ayuda para el diagnóstico, tal como reportan Alva *et al.*, (1980) y Schneider *et al.*, (1984) en infecciones experimentales de perros con quistes microscópicos de alpacas y llamas, respectivamente.

Por otro lado Leguía *et al.*, (1989a) en el examen parasitológico de las heces de perros infectados experimentalmente con macroquistes, revelaron la presencia de gran cantidad de ooquistes y esporoquistes de *Sarcocystis aucheniae*.

Para el diagnóstico se debe buscar en las deposiciones los ooquistes maduros de tipo *Isospora* de unos 12.15 x 16-20 µm con cuatro esporozoítos en su interior (Barriga, 2002). Al examen post mortem del hospedero definitivo, se puede observar la presencia de ooquistes en el tejido intestinal con microscopio óptico (Sam, 1998)

2.1.9.2.-Hospedero intermediario: Debido a la aparente ausencia de síntomas en infecciones naturales, la Sarcocystiosis muchas veces no puede diagnosticarse clínicamente (Leguía, 1987; Dubey *et al.*, 1989). Sin embargo en la necropsia se puede observar quistes macroscópicos a simple vista en la musculatura esquelética y, quistes microscópicos por microscopía en la musculatura cardíaca.

El diagnóstico presuntivo de la Sarcocistiosis aguda se basa en la eliminación de otros posibles agentes causales, evaluación epidemiológica del hato y su relación con otros animales (especialmente perros) así como, en los hallazgos clínicos (Dubey, 1986). Se considera que todos los rumiantes tienen algún sarcoquiste en su musculatura (Dubey, 1986).

Para el diagnóstico de la enfermedad en casos agudos se desarrolla la evaluación epidemiológica y clínica de la enfermedad, complementada con la utilización de pruebas inmunodiagnósticas como ELISA indirecta con alta sensibilidad para la detección de anticuerpos contra *Sarcocystis aucheniae* de alpaca. La prueba se estandarizó con antígeno de *Sarcocystis aucheniae* y suero de conejos anti macroquiste de *Sarcocystis aucheniae* (Sam, 1988; Ramírez, 1995; Castro *et al.*, 2004).

Con la finalidad de mejorar la especificidad en la detección de anticuerpos de alpacas con la técnica de ELISA se estandarizó un método utilizando la Proteína A conjugada con peroxidasa, esta prueba fue capaz de detectar anticuerpos en pequeñas cantidades y con buena especificidad (López, 1992).

La prueba EITB se utilizó para la detección de IgG anti *Sarcocystis aucheniae* en conejos. Se encontraron tres péptidos con movilidad relativa entre 58 a 50 kDa que fueron reconocidos por la IgG de conejos hiperinmunizados (Sam, 1996). Posteriormente se desarrolló y estandarizó una prueba EITB para la detección de anticuerpos anti *Sarcocystis*. Se utilizaron sueros hiperinmunes de conejo anti *S. aucheniae* y suero de alpacas infectadas naturalmente confirmadas mediante necropsia y otras procedentes de zonas libres de sarcocystiosis. Estas

tuvieron una reacción fuerte con bandas comprendidas entre 58 a 50 kDa, mientras que los sueros negativos y los sueros de animales neonatos no mostraron ninguna reacción (Sam, 1998).

Al examen post mortem del hospedero intermediario, se puede diagnosticar mediante observación de lesiones anatomopatológicas y presencia de quistes micro o macroscópicos en la musculatura lisa, estriada o cardíaca. En caso de la sarcocystiosis por *S. aucheniae* se realiza mediante la observación de macroquistes en musculatura estriada, lo que implicaría abrir los animales una vez sacrificados (Sam, 1998).

2.1.10.-Tratamiento

Es poco práctico, ya que no existe terapia efectiva contra infecciones agudas o crónicas. Así la administración experimental de anticoccidiales (amprolium, salinomicina, monensina, halofuginona, etc.) en vacunos y ovinos infectados con dosis letales de esporoquistes evitó la muerte y redujo la severidad de los síntomas clínicos. Sin embargo, la droga tuvo que ser administrada diariamente, durante un mes (Leguía, 1989b).

En el hospedador definitivo no existe tratamiento profiláctico ni terapéutico que evite el desarrollo de los ooquistes, los coccidiostatos no tienen efecto sobre las formas sexuales de esta coccidia (Fayer, 2004). Sin embargo tratamientos sintomáticos han sido efectuados en el hombre a base de corticoides luego de infecciones con *S. suis* y *S. bovis* (Gascon, 2006). Asimismo en equinos se han reportado tratamientos a base de antibióticos que inhiben la reproducción del protozooario sumado a antiinflamatorios que limitan la afección del sistema nervioso central y terapia de soporte (Melhorn, 1993; Barriga, 2002).

En equinos se utilizan inhibidores de Enzima dihidrofolatoreductasa (Sulfa y Pirimetamina), los cuales inhiben la enzima dihidrofolatoreductasa, esta enzima actúa como cofactor en varias reacciones metabólicas, incluso en producción de nucleótidos (Lindsay y Blagburn, 1995).

La administración de drogas anticoccidiales como el Amprolium (50-100 mg/kg peso vivo) por un periodo de 30 días puede prevenir la Sarcocystiosis clínica en los hospederos intermediarios pero, sólo si se administra al inicio de la enfermedad, este efecto se atribuye únicamente a la acción sobre los merontes de la infección inicial, no así en los quistes musculares (Leguía, 1987; CONCYTEC, 1988).

Anticoccidiales (amprolium, salinomycin, monensin, halofuginone, etc) administradas en vacunos y ovinos infectados con dosis letales de esporoquistes evitó la muerte o redujeron la severidad de los síntomas clínicos (Leguía, 1999).

El Diclazuril es utilizado en caso de tratamientos que no responden a terapias tradicionales, actúa inhibiendo las últimas fases de diferenciación celular .Produciendo muerte del parásito. La dosis es de 5 a 10 mg por kg/ día, durante 28 días (Bentz *et al.*, 2000).

El Toltrazuril, derivado triazínico, ha sido utilizado en *Sarcocystis* en cerdos, su efecto radica en la interrupción en vías intracelulares importantes para el metabolismo energético celular, como lo es la división celular; así mismo, se usa Ponazuril el cual es un metabolito sulfonado de Toltrazuril, la dosis es de 5 mg/kg/día por 28 – 90 días (Lindsay *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2001).

Los medicamentos probados hasta la fecha son caros y no muy prácticos de administrar (Leguía, 1989a). Además los CSA están continuamente infectándose y el efecto del fármaco es bastante corto. Por lo tanto la prevención y el control es lo más importante (CICCS, 1987).

2.1.11.-Prevencion y control

No existe una vacuna para proteger al ganado vacuno contra la sarcocistiosis clínica, aunque las investigaciones indican que los bovinos, ovinos, caprinos y cerdos pueden ser inmunizados con bajas dosis de esporoquistes (Dubey, 1986). Por lo tanto, la prevención es el único método disponible y práctica de control.

Los carnívoros (perros) deberían ser excluidos de los hábitats, alimentos, agua y dormidero de las alpacas. La cocción (80 °C), congelación (-10°C por 10 días) y el deshidratado (charqui de canal infectada), constituyen medios eficaces para la inactivación de *Sarcocystis*, pudiendo ser utilizados dichos procedimientos en el tratamiento de canal infectada para evitar su decomiso (Leguía, 1990).

Por otro lado, la carne contaminada con quistes de *Sarcocystis* puede ser expuesta a la acción de saturación con sal común y a la irradiación solar por un período de 5 días, observándose luego de este tiempo macro y microscópicamente la destrucción completa de los quistes, considerando esta técnica como una alternativa al procesamiento de carnes infectadas (Ayala, 1999). Además, un estudio de detoxificación de carne de llama, demostró los efectos

físicos de la cocción (100°C por 10 min), horneado (105 °C por 65 min), y congelado (-20 °C por 10 días), evaluando la sintomatología tóxica en conejos e irrupción del ciclo biológico del parásito en perros, concluyéndose que la cocción, horneado y congelado logran desnaturalizar y detoxificar la sarcocystina de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*; además afectan la viabilidad de los quistes (Godoy, 2007).

El control debe estar orientado esencialmente a prevenir la enfermedad a través de la interrupción del ciclo de vida del parásito, por lo tanto no debe permitirse que el perro y otros carnívoros silvestres ingieran carnes o vísceras crudas, ni despojos de reses muertas (CONCYTEC, 1988; Ramirez *et al.*, 1998; Leguía, 1999). La alimentación debe ser a base de comida enlatada, seca o cocida, y evitar que las mascotas cacen. No obstante, la educación de las personas es importante ya que la enfermedad al igual que la hidatidosis es creada por el hombre al no alimentar adecuadamente a sus animales (Leguía, 1990).

Estudios realizados por Hung *et al.*, (2006) demostraron el control de *Sarcocystis* a través de una vacuna, la cual ha sido elaborada con antígeno de macroquistes, logrando inmunizar a las crías de alpacas a los dos meses de edad, antes que la inmunidad materna descienda totalmente. La vacuna probada en forma experimental, debe ser validada a través de su aplicación en animales de aproximadamente un mes para observar si bajo condiciones de campo (naturales), se observa la misma respuesta de anticuerpos y posteriormente la protección contra la formación de los macroquistes.

Leguía, (1999) recomienda que la prevención es el método más importante para el control de la enfermedad señalando como medidas la implementación de programas de educación sanitaria, inspección sanitaria por médico veterinario, prohibición de matanza clandestina, mejoramiento higiénico sanitarias de los camales, incineración o entierro de canales no aptos para el consumo, no dejar abandonado en el campo alpacas o llamas muertas por diversos motivos, limitación del número de perros en zonas ganaderas y eliminación de perros vagabundos y zorros, en caso necesario la carne de los animales infestados con macroquistes debe ser tratada previamente antes de ser utilizado para cualquier fin.

2.1.12.-Epidemiología e impacto en la producción nacional

La infección por *Sarcocystis aucheniae* o sarcocistiosis, no solo atenta contra la salud del animal (La Perle *et al.*, 1999) sino que se traduce en importantes pérdidas económicas para la industria alpaquera derivada no solo de la disminución de la producción y de la productividad animal, sino por la pérdida de su valor comercial, el decomiso de la canal (Alva *et al.*, 1980) y por el rechazo de la carne en los mercados (Concha, 1999).

La infección por *Sarcocystis* es común en muchas especies de animales alrededor del mundo (Dubey, 1986). Se realizó un estudio en 200 alpacas sacrificadas para el consumo, con edades que fluctuaban entre los 2 y 15 años, hallándose quistes al examen macroscópico en el 16.5 % de las muestras de esófago, 26.5 % en la pierna y 27.5 % en el cuello. Mientras que, quistes visibles al microscopio se hallaron en el 100 % de las muestras de corazón, 99.5 % en las muestras de esófago, 95.5 % en las muestras de pierna y 87.5 % en las muestras de cuello (Guerrero, 1967).

Las pérdidas anuales producidas por el decomiso de carcasas infectadas con macroquistes de *Sarcocystis* se encuentran en \$300,000 dólares americanos (Leguía, 1991). Observándose en alpacas a partir de los 2 años de edad, la presencia de macroquistes en un 80%, siendo menor en alpacas menores al año de edad (Leguía y Casas, 1999).

Las pérdidas económicas son causadas por la infección con *Sarcocystis* quien forma quistes macroscópicos en la carcasa, lo que resulta en la condena de toda la canal o de las partes afectadas.

La importancia económica de la parasitosis en alpacas como causa de decomisos en el camal de Santa Rosa (Melgar Puno), fue evaluada en los años 1973 y 1974. De 5873 alpacas observadas, se decomisaron 529 canales por la presencia de *Sarcocystis aucheniae*, siendo ésta la segunda causa de decomiso (Alva *et al.*, 1980). En otro estudio se halló que el 3 % de decomisos de carcasas (seriamente afectadas) eran por la presencia de *Sarcocystis aucheniae*, beneficiadas en un camal regional del altiplano de Chile, entre 1985 y 1986 (Rojas *et al.*, 1993).

La parasitosis constituye la principal causa de decomiso de carnes camélidas, al igual que en otras especies; Alva *et al.*, (1980) y Vilca, (1991), afirman que en el Perú se decomisan entre 12 y 18% de los hígados de alpaca por causa de *Lamanema*, 9% de las canales por causa de *Sarcocystis*, 2.7 % de hígados y pulmones por hidatidosis, y el 0.1 % de hígados por distomatosis. Las cifras de sarcositosis pueden ser más altas según regiones.

2.1.13.-Salud publica

La Sarcocistiosis es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) y se debe considerar como una zoonosis tóxica, ya que se han reportado evidencias de trastornos gastroentéricos en personas que consumieron carne insuficientemente cocida infectada con *Sarcocystis aucheniae* debido a la acción de sustancias tóxicas dentro de los quistes (Leguía, 1989a; Sam *et al.*, 1998).

La Sarcocistiosis intestinal del hombre, parece tener una distribución mundial; mientras que la Sarcocistiosis muscular solo ha sido notificada en ciertos países como Egipto, India, Malasia y Tailandia (Acha, 2003).

La enfermedad se presenta como un cuadro gastrointestinal, donde hay una infección producida por coccidios del género *Sarcocystis*, que desde el punto de vista de la zoonosis interesan los siguientes: *Sarcocystis bovi hominis*, *Sarcocystis sui hominis*, que se ubican en el subepitelio intestinal y *Sarcocystis lindemani* que infecta la musculatura esquelética y cardíaca . El hombre se infecta por carnivorismo, al ingerir carne insuficientemente cocida de vacuno o de cerdo infectado respectivamente con sarcoquistes maduros de *S. bovi hominis* o *S. sui hominis* (Atías, 1995).

En el caso de individuos que ingirieron carne de alpaca y/o llama, infectada, principalmente niños, presentaron dolores estomacales, diarrea, escalofríos, náuseas y vómitos, lo que generalmente los pobladores atribuyen a que la carne de alpaca o llama es «fresca» (Leguía y Clavo, 1989b; Leguía, 1991).

2.2.-GRANULOCITOS

El examen de tinción sanguínea revela que hay varios tipos de leucocitos diferentes. Algunos leucocitos tienen un citoplasma lleno de gránulos, denominándose granulocitos los que poseen un núcleo lobulado y se subdividen en neutrófilos , eosinófilos y basófilos , según la avidez de sus gránulos citoplasmáticos por tinciones neutras , acidas o básicas respectivamente. A diferencia de los macrófagos , los granulocitos polimorfonucleares son células fagocíticas de corta vida (2-3 días , 6-7 horas en el perro). Gracias a la acción de factores quimiotácticos generalmente de tipo humoral , atraviesan el endotelio vascular por medio de procesos de marginación (adherencia de células endoteliales) y diapedesis ,penetrando finalmente en el intersticio tisular .Los granulocitos juegan un papel importante durante la inflamación aguda y debido a su rápida respuesta fagocítica constituyen una de las primeras líneas de defensa frente a microorganismos invasores . Los **neutrófilos** constituyen entre el 60 y el 75% de los leucocitos en sangre en muchos carnívoros, pero solamente el 50% en los caballos y del 20 al 30% en bóvidos, cabras y roedores de laboratorio (Tizard, 2009).

El neutrófilo, comparte con los demás elementos corpusculares de la sangre, un precursor común, la célula madre hematopoyética, y es el leucocito dominante en el torrente sanguíneo. (Roitt, 2008). Hay dos grupos de neutrófilos en la sangre: un grupo circulante y otro grupo de células secuestrado en los capilares. Durante las infecciones bacterianas el número de neutrófilos circulantes puede incrementarse diez veces, ya que son liberados desde la médula ósea y el conjunto de los secuestrados (Tizard, 2009).

Los neutrófilos que se encuentran en suspensión en la sangre son células redondeadas, de alrededor de 10 a 20 μm de diámetro .Tienen un citoplasma finamente granular, y en el centro del mismo, un núcleo segmentado irregularmente o en forma de salchicha .Debido a que la cromatina del núcleo es compacta, los neutrófilos no pueden dividirse. La microscopía electrónica muestra en su citoplasma la presencia de muchos tipos diferentes de gránulos ricos en enzimas como mieloperoxidasa , lisozima , elastasa , B-glucoronidasa y catepsina B. Otros gránulos no presentan mieloperoxidasa , pero contienen lisozima , colagenasa y lactoferrina , una proteína de unión al hierro (Tizard, 2009).

Los gránulos neutrófilos son de dos tipos principales:

a) **El gránulo primario azurófilo** se forma al inicio del desarrollo , presenta la morfología lisosómica y contiene una proteína inductora de la permeabilidad en la pared bacteriana con la cual se ataca las bacterias Gram negativas , mieloperoxidasa , proteasas neutras (elastasa , catepsinas G y D) , hidrolasas ácidas , beta glucoronidasa , fosfatasa ácida , alfa monocidasa (N-acetil-glucosaminidasa) , proteínas catiónicas y las defensinas . Éstas últimas tienen un amplio espectro de acción contra bacterias Gram negativas y Gram positivas así como contra virus .Estas proteínas pueden dañar tejidos cuando salen de los polimorfonucleares por degranulación externa en los procesos inflamatorios (Rojas, 2004).

b) **Los gránulos secundarios específicos** peroxidasa negativos que contienen lactoferrina, gran parte de la lisozima, fosfatasa alcalina y citocromo b 558 unido a la membrana. Los abundantes depósitos de glucógeno se utilizan en la glucólisis, lo cual les permite a las células actuar en condiciones de anaerobiosis (Roitt, 2008).

Antes de que los neutrófilos ataquen y destruyan a los microorganismos invasores , deben ser activados : Cuando los neutrófilos reciben la doble señal correspondiente a la unión de las integrinas y a la estimulación por $\text{TNF-}\alpha$, el Péptido Activador de Neutrófilo Linfocito Derivado (CXCL8) o C5a , secretan elastasa , defensinas y oxidantes .La elastasa liberada promueve su adhesividad .Los oxidantes activan a las metaloproteinas tisulares , las cuales inducen la liberación de más $\text{TNF-}\alpha$ por los macrófagos .El $\text{TNF-}\alpha$ a su vez atrae a más neutrófilos (Tizard, 2009).

Los granulocitos polimorfonucleares **eosinófilos** son ligeramente más grandes que los neutrófilos , suelen tener un núcleo bilobulado y múltiples gránulos citoplasmáticos con avidez por los tintes ácidos (por ejemplo , eosina) cuyo tamaño varia en funcion de la especie e incluso de la raza (por ejemplo , los eosinófilos en galgos poseen gránulos extremadamente pequeños en comparacion con los observados en otras razas caninas). Los eosinófilos constituyen del 2 al 6% del total de leucocitos circulantes según la especie , poseen en la superficie una serie de moléculas que les permiten realizar algunas de sus funciones , por ejemplo tienen receptores para la fracción cristalizable de la IgG ($\text{Fc}\gamma\text{R}$) y de la IgE ($\text{Fc}\epsilon\text{R}$) , ésta última está fundamentalmente implicada en procesos parasitarios y de hipersensibilidad de tipo I o alergia , por lo que los eosinófilos contribuyen de forma relevante en estas dos situaciones . Ciertos estímulos (principalmente citoquinas e IgG) inducen su desgranulación , este mecanismo es particularmente importante en el caso de patógenos que por su tamaño son difíciles de fagocitar

(por ejemplo , helmintos parásitos) ; tambien pueden liberar las enzimas histaminasa y aril sulfatasa , las cuales inactivan la histamina y los leucotrienos secretados por los mastocitos , produciendo un descenso en la respuesta inflamatoria asi como en la migracion de granulocitos al sitio de la invasion (Gómez ,2007).

Los granulocitos polimorfonucleares **basófilos** no presentan actividad fagocitica significativa , se encuentran en un número muy pequeño en la circulación (<0.5%) y se localizan muy raramente en tejidos extravasculares .Por otra parte , las células cebadas o **mastocitos** se consideran el equivalente tisular del basófilo , poseen características distintas a las que se observan en los basófilos circulantes , presentando una morfología menos globular y numerosos gránulos que enmascaran su núcleo.Los mastocitos asociados a mucosas dependen de los linfocitos T para su proliferación , a diferencia de los mastocitos presentes en el tejido conectivo , cuya activacion es independiente de linfocitos .Ambos tipos poseen gránulos que se tiñen con colorantes básicos (por ejemplo hematoxilina) y que contienen heparina , leucotrienos , histamina y el factor quimiotáctico eosinofílico de anafilaxis (responsable de la eosinofilia observada en las infestaciones parasitarias).El principal estímulo que desencadena el proceso de degranulación son alérgenos que , para ser efectivos , han de estar unidos a moléculas IgE que serán detectadas por medio de receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI) presentes en la superficie del mastocito (Gómez ,2007).

2.3.- MIELOPEROXIDASA (MPO) (EC 1.11.1.7*)

La enzima mieloperoxidasa (MPO) es una hemoproteína de unos 150 kDa, tetramérica, glicosilada .Está compuesta por dos protómeros, cada uno de los cuales posee una subunidad pesada protoporfirínica de 59-64 kDa, y otra ligera de 14 kDa (Nauseef y Malech 1986) .Está presente en neutrófilos y monocitos .Se almacena en gránulos azurófilos primarios de leucocitos y se secreta al espacio extracelular en fagolisosomas tras la activación de los fagocitos (Klebanoff y Clark 1978).

La activación fagocitaria y la secreción de MPO se acompaña de un aumento en la formación de anión superóxido, a partir de NADPH oxidasa, y del siguiente paso en la reducción univalente del oxígeno, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La MPO amplifica el potencial oxidante del H₂O₂ y lo utiliza como co-sustrato en la formación de oxidantes a través de un ciclo peroxidasa (Babior 1978).

La MPO presenta gran cantidad de estadios intermedios, influenciados por la disponibilidad para reducir el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Abu-Soud y Hazen 2000). Su estado basal es la forma férrica, y dependiendo del sustrato cambiará al estado iónico.

La actividad de la mieloperoxidasa está regulada por: La tasa de producción de anión superóxido; la disponibilidad de H_2O_2 y otros co-sustratos (Klebanoff y Clark 1978); la concentración de antioxidantes; (Marquez *et al.*, 1990; Kettle y Winterbourn 1997); presencia de óxido nítrico (NO) participante en la cadena de procesos inflamatorios, en especial en la regulación de las propiedades inflamatorias del endotelio y en los procesos de la migración de la célula inflamatoria a los lugares de la inflamación, y se entrelaza con el efecto oxidativo, siendo intermediario con el mismo (Abu-Soud y Hazen 2000).

El sustrato más importante es el Cloro, dando lugar al ácido hipocloroso (HOCl) (Weiss *et al.*, 1982; Foote *et al.*, 1983). Esta capacidad de producir oxidantes derivados del cloro es única de MPO en mamíferos ($\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MPO}} \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$).

El ion cloruro (Cl^-) del plasma probablemente se utiliza en la mayor parte de los lugares donde hay una reacción inflamatoria, excepto en la leche y la saliva, donde también se emplea el ión tiocianato (SCN^-). El H_2O_2 se transforma en compuestos bactericidas a través de la acción de la mieloperoxidasa, que es la enzima más importante del estallido respiratorio en los gránulos neutrófilos. La mieloperoxidasa cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno y los iones halógenos intracelulares (Cl^- , Br^- , I^- o SCN^-). (Tizard 2009).

El ión hipoclorito (OCl^-) es el más importante de los productos del metabolismo oxidativo de los neutrófilos. Debido a su intensa reactividad, no se acumula en los sistemas biológicos sino que desaparece a través de múltiples reacciones. Mientras haya H_2O_2 (y los neutrófilos pueden estar generando H_2O_2 durante tres horas tras su activación), la mieloperoxidasa utiliza el ion Cl^- para generar OCl^- , el cual destruye a las bacterias mediante la oxidación de sus proteínas y lípidos e intensifica las propiedades bactericidas de las enzimas lisosómicas (Tizard 2009).

Sin embargo, la mieloperoxidasa, no se ajusta a la definición clásica de una enzima. Por lo general, una enzima es específica en la reacción que cataliza y en su elección de sustratos. En contraste, mieloperoxidasa tiene muchos y variados sustratos, y cataliza al menos

tres reacciones diferentes. Este poder catalítico indiscriminado argumenta en contra de un papel singular para la mieloperoxidasa. Más bien, sugiere que su función será modulada por el medio local. Por lo tanto, tenemos que apreciar la complejidad de sus mecanismos de reacción para comprender cómo actúa dentro de fagosomas neutrófilos durante la matanza microbial y cómo contribuye a la inflamación (Tizard 2009).

** Nomenclatura determinada por la Comisión Internacional de Enzimas, precursora del vigente Nomenclature Committee o Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.*

2.4.- N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA (NAG) (EC 3.2.1.52*).

Los sinónimos de esta enzima son b-N-acetil-hexosaminidasa ; hexosaminidasa ; b-acetil-aminodeoxihexosidasa ; N-acetil-b-D-hexosaminidasa ; N-acetil-b-hexosaminidasa ; b-hexosaminidasa ; b-acetil-hexosaminidasa ; b-D-N-acetilhexosaminidasa ; b-N-acetil-D-hexosaminidasa ; b-D-N-acetilhexosaminidasa ; b-N-acetil-D-hexosaminidasa ; hexosaminidasa A ; N-acetil-hexosaminidasa y b-D-hexosaminidasa (Carrasco , 2007) .

Se trata de una enzima lisosómica del tipo de las hidrolasas que se sintetiza en las células tubulares proximales renales, que por su alto peso molecular (entre 130-140 kDa) no se filtra por el glomérulo y se excreta por la orina .Está implicado en la degradación de los mucopolisacáridos y glicoproteínas (Manjon, 2010).

La N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) , hidroliza aquellos compuestos que poseen terminales de N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina unidas por enlace beta : estos compuestos pueden ser gangliósidos , glicoproteínas animales , hialuronato , heparina , quitina , mucinas , condrotin sulfato , lipopolisacáridos capsulares , ácido teitoico , etc (Kopf *et al.*,1988).

También está presente en el hígado existiendo dos isoenzimas A y B en el suero y en el líquido cefalorraquídeo se ha encontrado concretamente un componente A que se distingue del hepático gracias a la cromatografía de intercambio iónico denominado AS (Manjon, 2010).

En la orina el 85% del NAG es de tipo A y el resto B, aunque el último componente aumenta en determinadas enfermedades parenquimatosas y tubulares renales. La excreción urinaria de NAG varía a lo largo del día, siguiendo un ritmo circadiano (Manjon, 2010). Todo lo que de ella se detecta en orina proviene de la fracción lisosomal y de otras fracciones subcelulares de las células del túbulo contorneado proximal (Borrego, 2003).

Un aumento en la excreción urinaria de NAG se observa en daño tubular de varias causas, incluyendo la nefrotoxicidad por drogas, el rechazo del trasplante renal y la nefritis tubulointersticial; también la NAG se ha encontrado elevada en la orina de pacientes humanos con varios tipos de enfermedad glomerular, uropatía obstructiva y nefroesclerosis. El encontrarse elevada en un gran número de enfermedades renales, limita su utilidad como herramienta diagnóstica, aunque es posible que sea válida en el seguimiento de algunas de ellas (Borrego, 2003).

El análisis de la NAG es altamente sensible como indicador de la alteración renal morfológica, presencia de anomalías estructurales o funcionales, reducción de la función renal; y además de este método predice alteraciones renales cuando no son aún detectadas por otras técnicas (Kopf *et al.*, 1988).

Johnston *et al.*, (1983) demostraron la mayor eficiencia de la NAG en comparación con otra enzima lisosomal, la beta-D-galactosidasa, y con enzimas de la membrana de las células con borde en cepillo del túbulo contorneado proximal, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, en detectar la existencia de alteraciones funcionales en riñón de pacientes hipertensos. Alderman *et al.*, (1983) propusieron el dosaje de la NAG para distinguir pacientes con disfunción renal de aquellos que tienen hipertensión esencial. Ellos estudiaron una serie de pacientes hipertensos en los cuales la excreción de NAG estaba aumentada en orina. A estos pacientes se les prescribió hidroclorotiazida, observándose en ellos una disminución de la presión arterial pero no de los niveles de NAG en orina en los primeros tres meses de estudio, normalizándose ambos parámetros al año. Esto indicaría que hasta tanto no haya una mejoría de la función y/o reversibilidad morfológica renal no se obtendrían niveles normales de NAG (Kopf *et al.*, 1988).

Otra de las aplicaciones de utilidad diagnóstica es la detección de nefrotoxicidad causada por la exposición a productos de la industria o a medicamentos, tanto si éstos son recibidos en forma crónica o aguda. Meyer *et al.*, (1984) realizaron un estudio en trabajadores

expuestos a ciertos elementos químicos tales como plomo , mercurio , cadmio y compuestos orgánicos volátiles , particularmente los hidrocarburos alifáticos halogenados que se hallan presentes en el ambiente laboral en niveles tan bajos que raramente causan evidencia clínica o de laboratorio de la existencia de una disfunción renal .Sin embargo , se vió en estos individuos un aumento de la NAG en orina , lo cual indicaría que dichas sustancias no son inócuas en niveles antes considerados seguros . En cuanto a la administración aguda de agentes potencialmente nefrotóxicos tales como gentamicina, o inhibidores del metabolismo hepático, aumentan el grado de enzimuria de NAG , mientras que inductores metabólicos como fenobarbital tienen el efecto inverso (Whiting *et al.*, 1986) .

Resulta evidente que la NAG es útil en el diagnóstico de lesión renal, indistintamente de cual fuere la etiología, en estadios más tempranos que otros métodos utilizados hasta el momento con una sensibilidad y especificidad similares a la B-2-microglobulina. Tiene, además, la ventaja de ser una técnica fluorométrica altamente sensible, no invasiva, que permite utilizar bajos volúmenes de muestra y hacer suficientes diluciones como para eliminar los efectos de los inhibidores endógenos .Es, además, un procedimiento barato y rápido, accesible a cualquier laboratorio (Kopf *et al.*, 1988)

En una investigación realizada por Carrasco (2007) se estudiaron las variaciones a lo largo del ciclo estral de la actividad enzimática de 7 exoglicosidasas (a-L-fucosidasa, b-N-acetil-glucosaminidasa, b-D-galactosidasa, a-D-manosidasa y b-N-acetil-galactosaminidasa , a-D-galactosidasa y neuraminidasa) , de la cantidad de proteínas y del volumen de fluido oviductal bovino y porcino teniendo en cuenta la importancia de las moléculas que contienen carbohidratos , como las glicoproteínas , glicolípidos y glicosaminoglicanos presentes en las superficies celulares , le da la opción a las glicosidasas presentes en el fluido oviductal de desempeñar potenciales funciones en el proceso de reproducción ya que estas enzimas catalizan la hidrólisis de las cadenas de oligosacáridos y modifican por tanto las interacciones entre células .Sin embargo , los niveles de actividad enzimática y sus fluctuaciones a lo largo del ciclo estral no han sido estudiados detalladamente en las especies bovina y porcina.

Tras analizar el fluido oviductal de un total de 237 oviductos bovinos y 269 porcinos , los resultados desvelaron que las 7 exoglicosidasas analizadas , el fluido oviductal bovino y fluido oviductal porcino no presentan actividad para dos de ellas (a-D-galactosidasa , neuraminidasa) en ninguna de las fases del ciclo estral estudiadas pero si las otras 5 (a-L-fucosidasa, b-N-acetil-glucosaminidasa, b-D-galactosidasa, a-D-manosidasa y b-N-acetil-galactosaminidasa).

De los resultados obtenidos se pudo deducir que tanto el fluido oviductal bovino como el fluido oviductal porcino muestran actividad a-L-fucosidasa, b-N-acetil-glucosaminidasa, b-D-galactosidasa, a-D-manosidasa y b-N-acetil-galactosaminidasa con variaciones a lo largo del ciclo estral en algunas de ellas, lo que podría indicar un papel de estas exoglicosidasas en el proceso de reproducción, aunque dicho papel, debe ser demostrado en futuras investigaciones. Así, es posible que la b-N-acetil-glucosaminidasa pudiera participar en la dispersión de las células del cúmulus, en la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida y también en la remodelación de la misma.

* *Nomeclatura determinada por la Comisión Internacional de Enzimas, precursora del vigente Nomenclature Committee o Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.*

2.5.-ANTICUERPOS POLICLONALES

Las proteínas suelen ser inmunógenos excelentes (es decir, sustancias capaces de inducir una respuesta inmunitaria), aunque de manera típica la respuesta inmunitaria se concentra contra pequeñas regiones dentro de la proteína (denominados epítomos o determinantes antigénicos) que están representadas por alrededor de 5 a 8 aminoácidos. Así, la inyección de un antígeno común en un animal casi siempre induce la producción de una mezcla de anticuerpos que se dirigen contra epítomos diferentes dentro del antígeno. También es muy posible que algunos de los anticuerpos dentro de esta mezcla se dirijan hacia epítomos que se encuentran asimismo en otros antígenos. Se dice que estos anticuerpos reaccionan en forma cruzada contra el otro antígeno al que también se unen (Roitt, 2008).

Para generar un anticuerpo contra una proteína determinada, el procedimiento usual es inyectar muestras pequeñas de la proteína (en el orden de microgramo) en un animal como el conejo. Sin embargo, la administración de antígeno solo rara vez es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria potente, aún cuando el antígeno está compuesto por una proporción alta de determinantes no propios; se requiere la administración conjunta de un adyuvante. Si bien no está completamente claro el mecanismo exacto de acción de los adyuvantes, una función destacada de éstos es activar las células dendríticas (DC) y las células presentadoras de antígeno (CPA) en el sitio donde se libera el antígeno. La activación de las CPA refuerza su capacidad de proporcionar señales coestimuladoras necesarias para la activación eficaz de las células T y las células B ante el encuentro con el antígeno. Los adyuvantes potentes suelen ser preparados crudos de extractos bacterianos que contienen mezclas de ligandos para el receptor de tipo Toll (TLR), como lipopolisacáridos (LPS) o peptidoglucano (Roitt, 2008).

2.6.-WESTERN BLOTTING

El Western blotting , inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular) (Towbin H *et al.*, 1979; Renart J. *et al.*, 1979).

Mediante anticuerpos específicos y altamente sensibles se pueden analizar componentes concretos de una mezcla compleja de proteínas .La separación de las proteínas se realiza mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida de mezclas proteicas que fueron desnaturalizadas por calentamiento en presencia de un detergente , el decilsulfato de sodio (SDS-PAGE) .Sin embargo mientras las proteínas están aún en la matriz del gel no pueden ser alcanzadas por las grandes moléculas de los anticuerpos .Por ello se extraen del gel y se colocan en una fina membrana de nitrocelulosa o polivinildifluoruro (PDVF) .Para ello se coloca el gel de SDS sobre la membrana y se aplica verticalmente con respecto a nivel del gel una corriente eléctrica . Las micelas de SDS-proteínas se transfieren electroforéticamente hacia el ánodo desde el gel hacia la matriz , y se produce una impresión de la muestra de la proteína en la membrana .Ésta une las proteínas transferidas con fuerza .Los puntos de unión restantes de la matriz se saturan con proteínas (por ejemplo de leche en polvo)antes de añadir el **anticuerpo primario** ; dado que éste es una proteína , se debe evitar que se produzca un enlace no específico a la membrana .En sí , la unión del anticuerpo no es visible , pero aportando un **anticuerpo secundario** generado contra el anticuerpo primario se muestra la banda de proteína : el anticuerpo secundario tiene enlazada una enzima que cataliza una reacción de coloración (Esterl *et al.*, 2008) .

Es obvio que el procedimiento no funciona con antígenos que sufren desnaturalización irreversible por este detergente, y es mejor utilizar antisueros policlonales para inmunotransferencia con el fin de aumentar la oportunidad de incluir anticuerpos contra cualquier epítipo que sobreviva al procedimiento de desnaturalización; un número sorprendente lo hace (Roitt, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.-Lugar de estudio

El estudio se ha realizado en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección de Virología Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada en el distrito de San Borja, Lima – Perú.

3.2.-Material biológico

Los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, se recolectaron de 5 alpacas infectadas naturalmente y sacrificadas en el camal municipal del departamento de Huancavelica, provincia de Huancavelica.

Se obtuvo sangre de 3 conejos con anticoagulante (heparina) de la raza Nueva Zelanda, de 2 a 3 kg de peso y de 1 año de edad procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos del departamento de Lima, provincia de Lima, distrito de San Borja.

3.3.-Obtención de muestras

3.3.1.-Extracto proteico de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*:

3.3.1.1.-Obtención de macroquistes

Se tomaron 10 gramos de macroquistes de los animales infectados naturalmente, utilizando pinzas y tijera estériles, libres de fibras musculares y conservando sus respectivas envolturas quísticas, y colocados en PBS evitando así que los macroquistes se deshidraten.

3.3.1.2.-Preparación del extracto de macroquistes

Los macroquistes obtenidos fueron molidos en un mortero frío con 5 ml de Tampón Fosfato Salino (PBS) hasta obtener una pasta homogénea. Luego se centrifugó por 10 minutos a 3000 RPM a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en Medio Mínimo Esencial (MEM) en la proporción de 1 en 2.

Esta suspensión fue sometida a ultrasonido (sonicado), para la ruptura de membranas celulares, de manera que se expuso el pellet de macroquistes con MEM a ultrasonificación (Fisher-300) durante 60 ciclos/s en intervalos de 60 segundos cada uno. Se observó, vía microscopio, la destrucción de membranas celulares. Los productos sonicados fueron centrifugados a 1200 RPM durante 20 minutos, siguiendo el protocolo descrito por Sam (1998). Se colectó el sobrenadante y el pellet de forma separada, guardándose en congelación a -20 °C para su preservación.

La concentración de proteínas totales (antígenos totales) del extracto obtenido del pellet fue medido mediante el kit Qubit Starter (Invitrogen, USA) empleando el reactivo designado para proteínas y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de antígeno total fue ajustada para los distintos tratamientos mediante dilución en MEM libre de antibióticos.

Seguidamente se ajustaron a las diluciones para contener: **0.5, 1, 50, 500, 1000 ng/100µl** (medidas por espectrofotómetro con una longitud de onda de 540 nm.) utilizándose como vehículo MEM sin antibiótico.

3.3.2.-Cultivo de leucocitos de conejo

Se procedió al centrifugado de la sangre a 2500 rpm durante 5 min. , esto permitió la separación en tres componentes visibles: plasma, capa flogística (leucocitos) y el cúmulo eritrocitario. Se colectó la capa flogística producto de la centrifugación en crioviales de 2ml de capacidad, los que fueron sometidos al tratamiento de lisis de glóbulos rojos mediante la incubación con Cloruro de amonio por 1 hora aprox., tras los cuales se centrifugó la muestra de leucocitos y se lavó 3 veces con PBS (0.15M pH 7.2). Los leucocitos obtenidos se tiñeron con azul de tripán al 0.3% en proporción 1: 2 con los leucocitos resuspendidos en MEM, se contaron las células vivas a través de la cámara de Newbauer en microscopio óptico 40x. Se empleó la fórmula siguiente para calcular el número de células vivas totales de la suspensión (Darling, 1993):

$$\text{Número de leucocitos/ml} = \text{Promedio de la sumatoria de los 4 cuadrantes} \times 2 \times 10000.$$

La concentración de leucocitos se ajustó a 500 000 células/ml resuspendidas en MEM.

Paralelamente se hizo un ensayo en el que se usó sangre humana , con el fin de evidenciar las proteínas de degranulación leucocitaria, se separaron en cuatro muestras: el plasma que posteriormente se usó en su estado puro sin dilución ; una muestra se trató de la misma manera que la sangre de conejo (usando el buffer de lisis) , en la obtención de leucocitos y las otras dos muestras conteniendo la capa flogística y cúmulo eritrocitario fueron diluidas una en agua bidestilada y la otra en PBS , llevadas a congelación por 10 minutos y posteriormente descongeladas . Estas muestras no fueron enfrentadas con el extracto de macroquistes y continuaron su recorrido de la misma manera posterior que las muestras de leucocitos de conejo enfrentadas para evaluar el efecto de la de granulación leucocitaria.

DILUCIONES				
Nombre	Dil 1H	Dil 2H	Dil 3H	Dil 4H
Componentes	Plasma puro	Tratamiento con buffer de lisis.	Tratamiento con agua bidestilada	Tratamiento con PBS

Cuadro N°1: Nomenclatura de las diluciones de la muestra humana de sangre.

3.4.-Procedimiento

3.4.1.-Efecto sobre la viabilidad

El extracto proteico de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* en las diferentes diluciones (0.5ng/100µl, 1ng/100µl, 50ng/100µl, 500ng/100µl y 1000ng/100µl) se enfrentó a los leucocitos de conejo (500 000 células/ml) en placas de cultivo de 24 pocillos a 37°C x 1 y 12 horas.

Una suspensión de leucocitos fue tratada sólo con PBS (grupo control) en la misma cantidad de los inóculos. Finalizado el tiempo de incubación se hizo el recuento de células vivas con Tinción Azul de Tripán y la cámara de Neubauer. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

DILUCIONES						
Nombre	Dil 1C	Dil 2C	Dil 3C	Dil 4C	Dil 5C	Control
Concentración	1000 ng/100µl	500 ng/100µl	50 ng/100µl	1 ng/100µl	0.5 ng/100µl	SF/100µl

Cuadro N°2: Nomenclatura de las diluciones del concentrado de macroquistes de *S.aucheniae*

Estas diluciones se enfrentaron a los leucocitos de conejo (500 000 células/ml) a 37°C x 1 y 12 horas.

3.4.2.-Efecto sobre la degranulación de leucocitos

3.4.2.1.-Precipitación de proteínas

Se tomó 100 µl de sobrenadante de cada tratamiento (1 y 12 horas de incubación) se agregó 25 µl Acido Tricloroacético (TCA) y se llevó a 4°C por 10 minutos y posteriormente a -20°C por 24 horas. El sobrenadante precipitado con TCA se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, luego se adicionó 100 µl de acetona y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y finalmente se reconstituyó con 40 µl de PBS y se guarda a -20°C.

3.4.2.2.-Electroforesis de muestras de proteínas

Se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE) para la visualización de las distintas proteínas contenidas en el sobrenadante de los tratamientos.

Es la primera etapa de la Técnica de Western Blotting y consiste en la electroforesis de la mezcla de proteínas en un gel de tal forma que cada componente se separa del resto en una banda única

Fue descrito por Laemmli (1970). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por isotacoforesis de la muestra en el primer gel (concentrador o 'stacking'). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl^- de los tampones de carga en el gel de apilamiento ('stacking').

Reactivos para el gel de separación 12%

Agua bidestilada	1680µl
Poliacrilamida 30%	1600 µl
Buffer de separación ⁽¹⁾	890 µl
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	21 µl
Persulfato amónico (PSA) 10%	30µl
TEMED(N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina)	10µ

⁽¹⁾4X Running Gel Buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Preparación del gel

Se vertieron el agua bidestilada, poliacrilamida 30% y el buffer de separación evitando el contacto con el oxígeno en un quitasato, luego el SDS 10%, PSA 10% y por último TEMED en este orden mezclando cuidadosamente para no formar burbujas, y se vertió en el molde a la altura de 2 cm desde el borde superior del cristal pequeño y encima agua para crear un peso adicional y nivelar el gel. El resto de la mezcla se puso en un vial eppendorf como testigo de la polimerización. Se dejó polimerizar por 1 hora a temperatura ambiente

Reactivos para el gel concentrador 7% (STACKING)

Agua bidestilada	467 µl
Poliacrilamida 30%	500 µl
Buffer de concentración ⁽²⁾	1033 µl
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	17.2 µl
Persulfato amónico (PSA) 10%	6 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina)	12 µl

⁽²⁾4X Stacking Gel Buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Preparación del gel

Una vez polimerizado el gel de separación se elimina el agua de encima y se secó cuidadosamente. La mezcla de stacking se prepara en el mismo orden que la mezcla para el gel de separación. Se vertió en el molde hasta el tope y se colocó el peine. Se dejó polimerizar por 1 hora a temperatura ambiente.

En los pocillos formados por el peine se adicionaron las muestras mezcladas con el buffer de carga 2x (10 µl de muestra del procedimiento anterior x 10 µl de buffer de carga) dentro del tanque previamente llenado con buffer de electroforesis.

Se realizó la electroforesis aplicando corriente continua (50 voltios los primeros 20 minutos y luego 75 voltios durante tres horas), de las muestras en minigeles de 8cmx10cmx0.75mm incluido el marcador de peso molecular pre teñido Perfect Protein™ Markers, 10-225 kDa ya que también será transferido y permitirá ver el peso de las proteínas transferidas teñidas. La electroforesis se realizó en el tanque de electroforesis vertical (Biorad, USA).

3.3.2.3.-Transferencia de las proteínas a la membrana.

Cuando terminó la electroforesis, se retiró el gel y se equilibró 30 minutos a temperatura ambiente en buffer de transferencia. Es necesario equilibrar para evitar cambios en la dimensión del gel que resultan en patrones borrosos, también debe emplearse el buffer de transferencia adecuado para cada gel.

Después de la separación electroforética de las proteínas por su peso molecular, éstas se transfieren desde el gel de electroforesis a la membrana electroforéticamente aplicando corriente continua de 80 v por 150 min la migración irá del cátodo (-) hacia el ánodo (+).

Este procedimiento se basa en la movilidad electroforética de las proteínas para transferirlas desde el gel hasta la membrana e implica poner en contacto directo el gel de poliacrilamida con las proteínas con la membrana de nitrocelulosa para la unión de las mismas, formando un sándwich entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora.

Entonces se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida. En esta etapa se incluyen los siguientes pasos:

En el soporte plástico (-) se colocó la esponja seguida de una hoja de papel filtro cortado del mismo tamaño del gel y pre humedecido con buffer de transferencia y sobre éste el gel asegurándonos de no formar burbujas entre el gel y el papel filtro.

La membrana de nitrocelulosa cortada del tamaño del gel empapada en agua destilada y equilibrada de 10 a 15 minutos en buffer de transferencia es colocada en el lado libre del gel también previamente humedecido en buffer de transferencia, a esto sigue otra hoja de papel filtro y finalmente la esponja, todas ellas humedecidas previamente en buffer de transferencia. Se completa el armado cerrando la parte superior del cassette de modo que la membrana esté hacia el lado del ánodo (+) del tanque. Con el cassette sumergido en el tanque lleno con buffer de transferencia y en el aparato con la orientación correcta se transfirieron electroforéticamente las proteínas del gel a la membrana por 30 minutos a 1 hora a 100V. El armado fue hecho bajo el buffer de transferencia para minimizar la formación de burbujas de aire entre las hojas del sándwich.

3.4.2.4.-Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos

Consiste en bloquear los sitios de unión de la membrana sin reaccionar con el antígeno, para reducir la unión inespecífica de las proteínas durante los siguientes pasos del ensayo y lo que hace es incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de fondo.

El tampón de bloqueo se va a unir a todos los potenciales sitios de unión inespecífica de la membrana, eliminando todo el ruido de fondo sin alterar o bloquear los epítomos para la unión del anticuerpo primario. La membrana se colocó en 5ml de buffer de bloqueo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.

3.4.2.5.- Adición de anticuerpos primarios y secundarios

Los anticuerpos primarios usados fueron:

1. HEXA N-19 200ug/ml (sc 48530) origen humano, goat policlonal IgG para detectar glucosaminidasa.
2. MPO heavy chain 200ug/ml H-300 (sc 33596) origen humano, rabbit polyclonal IgG para detectar mieloperoxidasa.

De la misma manera, hay una gran variedad de anticuerpos secundarios marcados de diferentes maneras para la detección del Western Blot. Su elección depende de la especie en la que se haya obtenido el anticuerpo primario (la hospedadora); por ejemplo, si el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal de ratón, entonces el secundario debe ser un anticuerpo anti-ratón obtenido en un hospedador diferente del ratón. El anticuerpo secundario que usamos fue Goat anti Rabbit (policlonal) 1:3000 conjugado con HRPO.

En esta etapa se eliminó el buffer de bloqueo y se reemplazó con la solución de Acs. primarios diluidos. La dilución se determina empíricamente de 1/100 a 1/1000 para Acs. policlonales, 1/10 a 1/100 para Acs. obtenidos de sobrenadante de hibridoma y $\geq 1/1000$ para fluido ascítico de ratón conteniendo Acs. monoclonales.

En nuestro caso como se trata de Acs. policlonales la razón fue de 1/1000 en el buffer de bloqueo y se dejó incubar una hora a temperatura ambiente con agitación constante en el termociclador.

Al emplear bandejas de plástico, el volumen de Ac primario y secundario se incrementa a 50 ml luego se removió la membrana y se lavó 4 veces mediante agitación con 200 ml de solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TTBS) , de 10 a 15 minutos por lavado. Seguidamente el anticuerpo secundario conjugado en diluido en buffer de bloqueo.

Los Acs. secundarios comerciales se diluyen 1/200 a 1/2000 previo al uso. En nuestro caso se usó 1/200 e igualmente se incubó por una hora, similar al anterior, se removió la membrana y se lavó 4 veces mediante agitación con 200ml de TTBS, de 10 a 15 minutos por lavado.

3.4.2.6.-Revelado

Se empleó la técnica de visualización membrana mediante substratos cromogénicos Amino-9-etil-carbazol (AEC); este reactivo fue empleado por primera vez para la demostración de la actividad peroxidasa exógena por Grahman, Lundholm y Karnovsky (1965). En esta fase se emplea la membrana con proteínas transferidas y sondeadas con complejo anticuerpo-enzima; solución salina tamponada con Tris (TBS) y el reactivo AEC.

La preparación es como sigue: Amino-etil-carbazol (2.0 mg) en Dimetilformamida (0.5 ml), una vez diluido se añadió amortiguador acetato 50 mM pH 5,0 (9.5 ml); esto 10 minutos antes del revelado e inmediatamente antes de usar 10 ul de peróxido de hidrogeno al 3%.

IV. RESULTADOS

4.1.-Efecto sobre la viabilidad leucocitaria

Se realizó la prueba de ANOVA de los grupos tratados, utilizando las medias del recuento de células vivas por tratamiento.

Sobre los tratamientos, el recuento de células a la hora de incubación demostró que existe mortalidad alta entre 57.9.7% y 57.7% en todos los grupos de tratamiento (desde 0.5 hasta 1000ng/100µl de antígeno), observándose que no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre las medias del número de leucocitos que sobreviven a cada tratamiento. La mortalidad en el grupo control de suero fisiológico alcanza 5% a la hora de incubación. Por tanto, existe un efecto citotóxico importante provocado por extracto proteico de *S. aucheniae* sobre los leucocitos de conejo evidenciado a la hora de enfrentamiento y con una concentración proteica desde al menos 0.5ng/100µl en adelante.

1 hora				
Diluciones	1000ng/100µl	50ng/100µl	0.5ng/100µl	SF/100µl
Total (x10 ⁴ cel/ul)	500	500	500	500
Vivos (x10 ⁴ cel/ul)	211.5	209.5	210.5	475.0
% Mortalidad	57.7	58.1	57.9	5
% Vivos	42.3	41.9	42.1	95

Cuadro N°3: Resultado de la incubación de las diferentes concentraciones del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* a los leucocitos de conejo durante una hora.

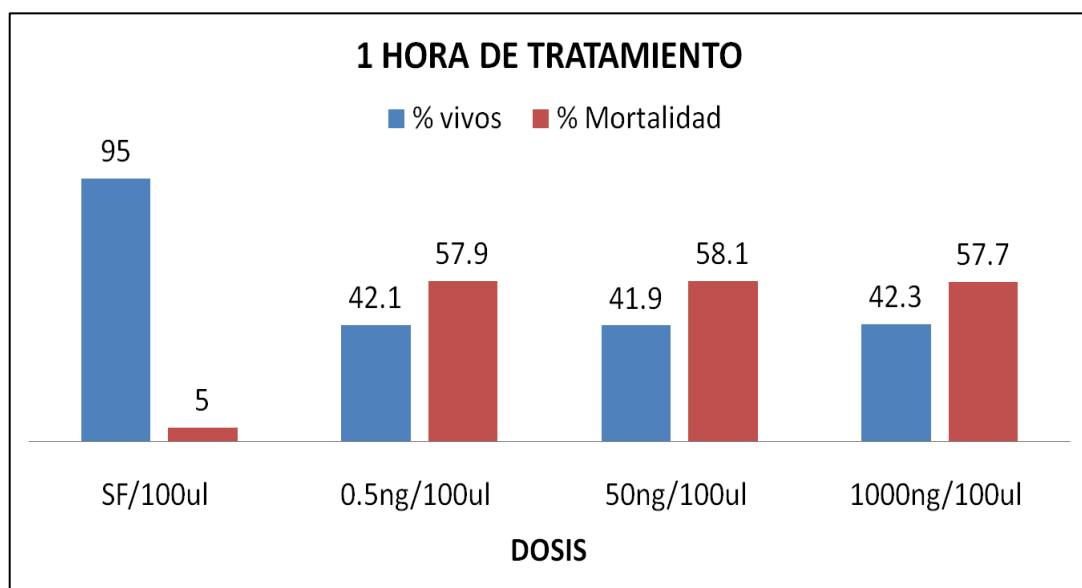


Grafico 1: Se muestra el porcentaje de mortalidad leucocitaria a la primera hora de exposición al extracto proteico de *Sarcocystis aucheniae*.

12 horas						
Diluciones	1000ng /100µl	500ng /100µl	50ng /100µl	1ng /100µl	0.5ng /100µl	SF /100µl
Total (x10 ⁴ cel/ul)	500	500	500	500	500	500
Vivos (x10 ⁴ cel/ul)	16	3	40	45	174	214
% Mortalidad	96.8	99.4	97	71	65.2	57
% Vivos	3,2	0,6	3	29	34,8	43

Cuadro N°4: Resultado de la incubación de las diferentes concentraciones del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* a los leucocitos de conejo durante doce horas..

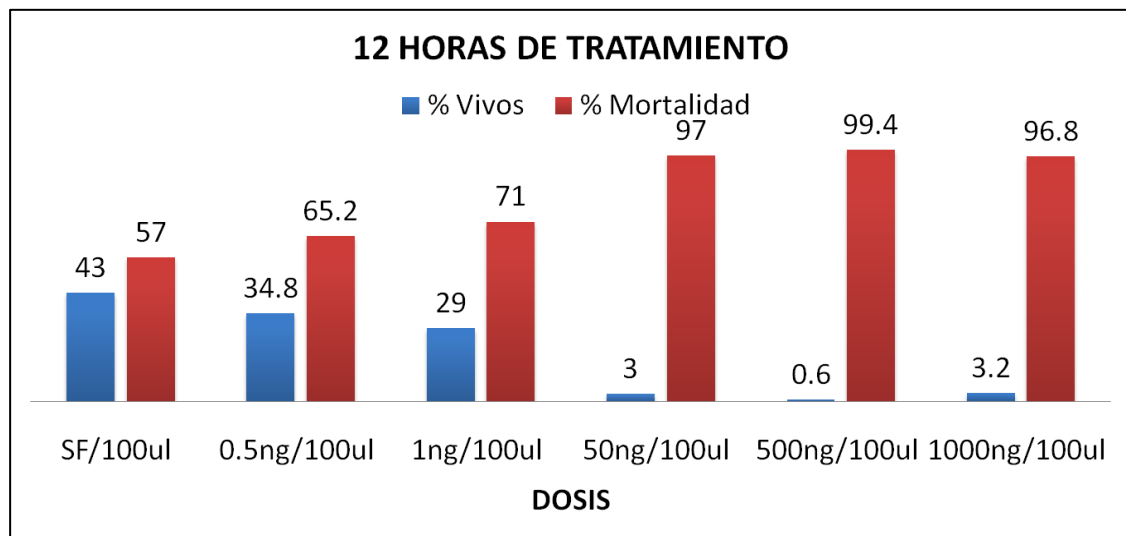


Grafico 2: Se muestra el porcentaje de mortalidad leucocitaria a las 12 horas de exposición al extracto proteico de *Sarcocystis aucheniae*.

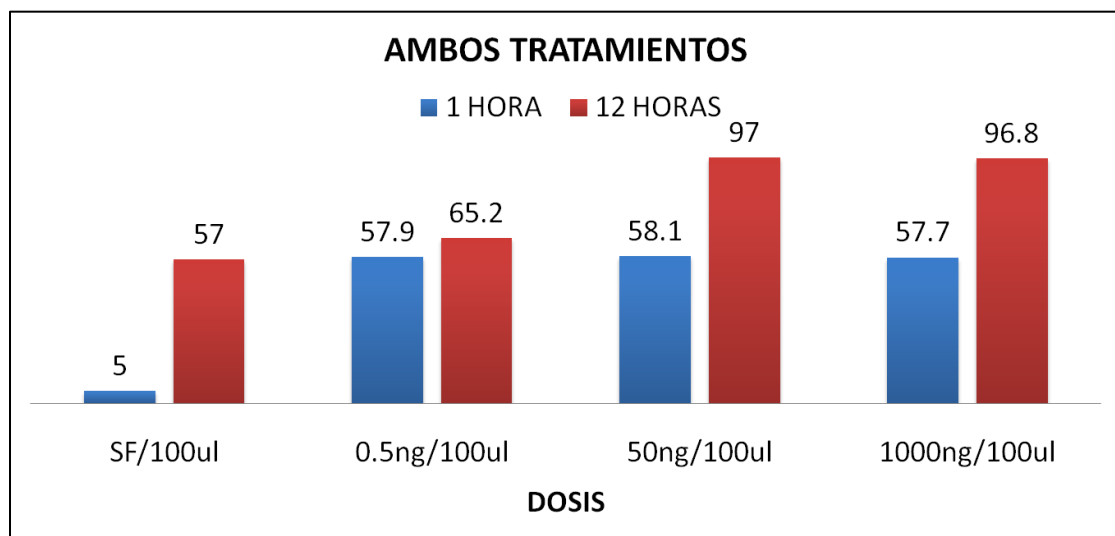


Grafico 3: Se muestra el porcentaje de mortalidad leucocitaria a la primera hora vs. 12 horas de exposición al extracto proteico de *Sarcocystis aucheniae*.

4.2.-Efecto sobre la degranulación de leucocitos

Será cualitativo, evidenciado por la presencia de bandas coloreadas en el papel de nitrocelulosa de la enzima Mieloperoxidasa y Glucosaminidasa en los distintos grupos tratados.

Los estudios sobre la degranulación de leucocitos de conejo en presencia de extracto proteico de *S.aucheniae*, visualizado empleando la técnica SDS PAGE, muestran que existe secreción de proteínas diferentes a las observadas en el control inoculado con suero fisiológico en algunos de los tratamientos. Se observan proteínas celulares de 160 kDa, 120 kDa y múltiples proteínas por debajo de los 75kDa, cabe mencionar que la mieloperoxidasa (MPO) monomérica pesa 72 kDa, mientras que la hexosaminidasa madura (HEXA) (un producto lisosomal) pesa 54 kDa (tizard, 2002).

Asimismo, es posible observar variedad de proteínas del extracto de *S.aucheniae* donde se observan alrededor de 10 proteínas: 3 proteínas por encima de los 225kDa, una proteína de alrededor de 160 kDa, una proteína de 120 kDa, una proteína de 100 kDa, dos proteínas entre 80 y 85 kDa, y dos proteínas de alrededor de 60 y 65 kDa (Figura 1). Por otro lado, existe diferente concentración de estas distintas proteínas de acuerdo a la intensidad de la coloración de las bandas con Azul de Coomasie, observándose que las de mayor concentración son las que pesan más de 225 kDa, la banda de 120 kDa aprox., y las bandas de 80-85 kDa.

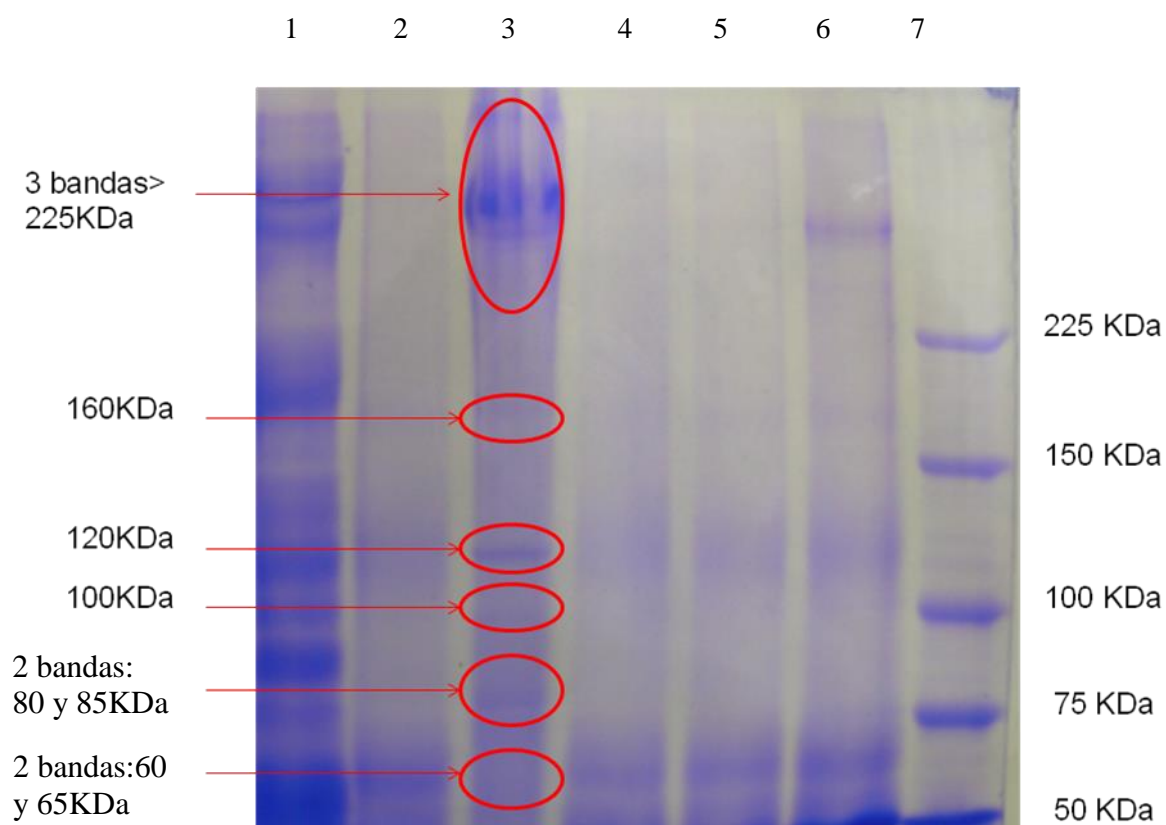


Figura 1. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomasie del sobrenadante de cada tratamiento. 1. Plasma de conejo, 2. Plasma de conejo diluido 1:50, 3. Extracto proteico de *S.aucheniae*, 4. Tratamiento de leucocitos con 0.5ng/100ul de *S.aucheniae*, 5. Tratamiento de leucocitos con 50ng/100ul de *S.aucheniae*, 6. Tratamiento de leucocitos con 1000ng/100ul de *S.aucheniae*, 7. Marcador Novagen Perfect Protein Markers 10-225 kDa

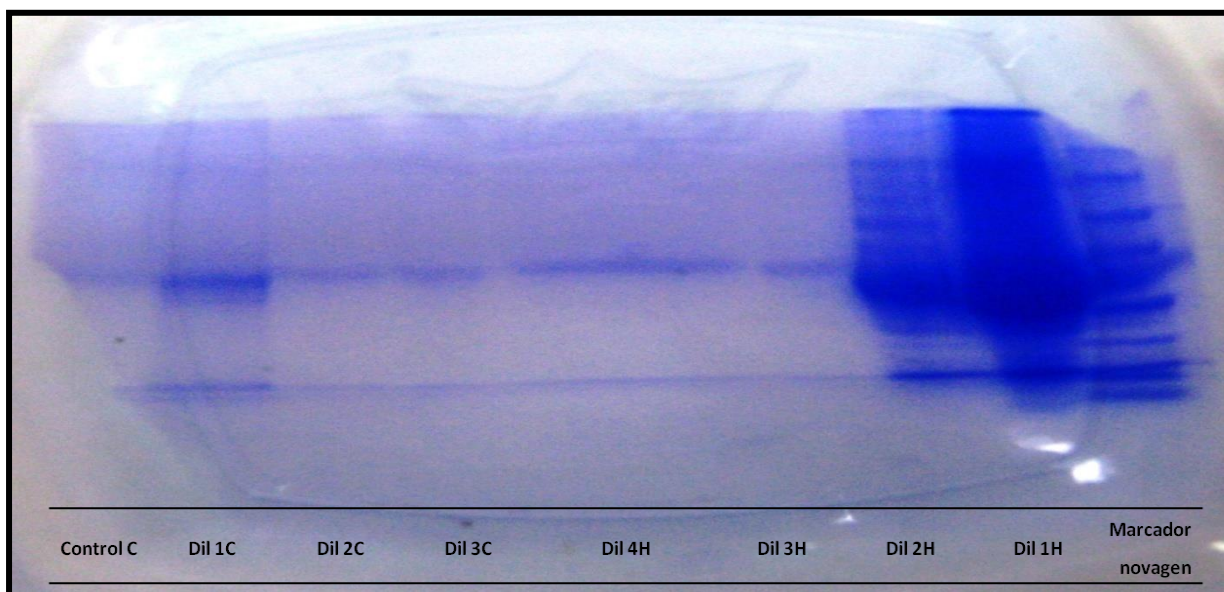


Figura 2. A.- Gel de Electroforesis teñido con Azul de Coomassie. Se observan las bandas de proteínas de diversos tamaños en los extractos obtenidos por tratamientos de leucocitos con *S. aucheniae*.

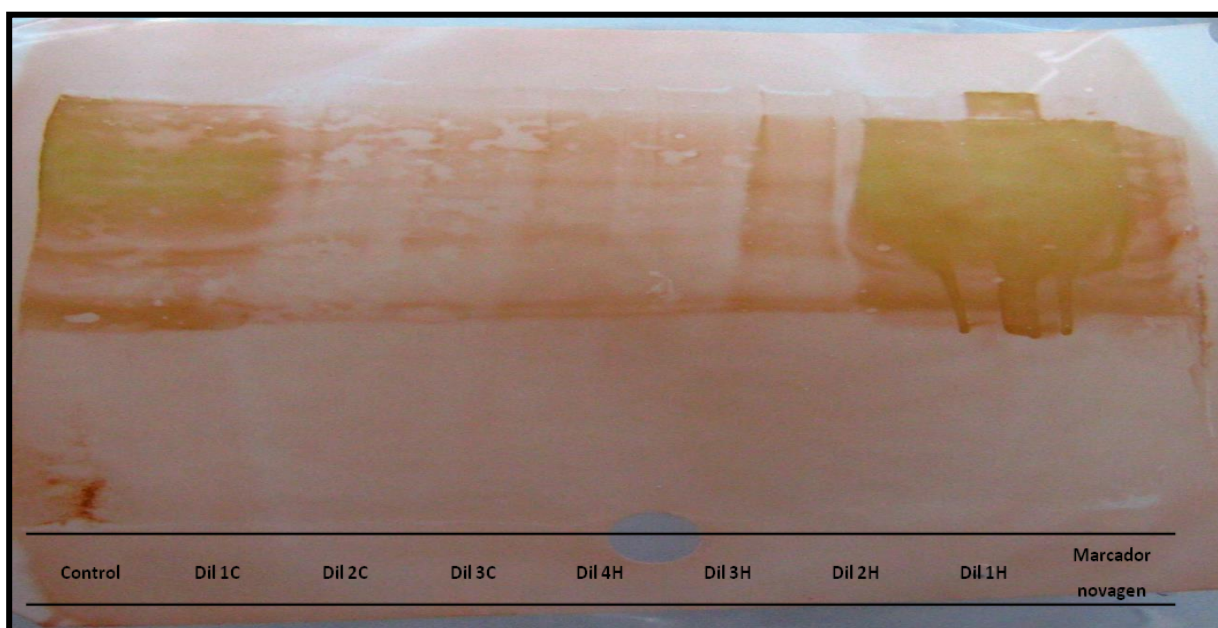


Figura 2.B.- Western blotting de las proteínas de los geles de electroforesis utilizando anticuerpos anti mieloperoxidasa y glucosaminidasa.

V. DISCUSION

Es sabido que los lisados de macroquistes de *S. aucheniae* , contienen compuestos proteicos con acción tóxica compatibles con los constituyentes de la toxina denominada Sarcocistina referida por Senaud y Cerna (1978) y Hipie *et al* (1981) .Este producto produce la muerte en conejos , debido a alteraciones agudas en órganos vitales , especialmente en órganos detoxificadores , como el riñón e hígado al ser inoculados en dosis de 50,100,200,400,800,1600 ug de proteína por g. de peso vivo .Así mismo , se demostró la resistencia de ratones y cobayos a la acción tóxica de lisados de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* (Sam 1998) . En el presente trabajo, la viabilidad leucocitaria *in vitro* se establece con respecto a una dilución control compuesta por los leucocitos es suspensión con solución salina fisiológica, de esta forma se busca hallar la citotoxicidad correspondiente únicamente al compuesto en estudio y no al vehículo en el que está disuelto cuantificándolos a la hora y a las doce horas después de ser expuestos. Un compuesto se considera citotóxico cuando el porcentaje de viabilidad es inferior al 80% con un coeficiente de variación no mayor al 20% (Rodríguez y Vergel, 2004).

La respuesta inmune en el hospedero intermediario que se desarrolla frente a los protozoos es similar a la que se desencadena en bacterias. Donde los antígenos protectores *del Sarcocystis aucheniae* están asociados con la formación de fases sexuales; la expresión de la inmunidad depende de la actividad de las células T las cuales colaboran con la producción de anticuerpos neutralizantes contra los esporozoítos así como también la liberación de linfocinas que tratan de inhibir la multiplicación de las fases intracelulares; tratando de conseguir la disminución de los síntomas clínicos y la reducción del número de ooquistes (Urquhart *et al*, 2001).En un trabajo realizado por Hinostroza (2012) utilizado RT-PCR se demostró que el extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* a dosis de 0.5, 1, 50, 500, 1000 ng/ml a 1, 12 y 24 horas de inoculado sobre leucocitos circulantes de alpaca, *in vitro*, inducen una respuesta inflamatoria, evidenciada por la detección y cuantificación relativa de las interleuquinas proinflamatorias IL-1 α , β , IL-6 y TNF α .

A diferencia de los macrófagos, los granulocitos polimorfonucleares son células fagocíticas de corta vida (2-3 días, 6-7 horas en el perro). Gracias a la acción de factores quimiotácticos generalmente de tipo humoral, atraviesan el endotelio vascular por medio de procesos de marginación (adherencia de células endoteliales) y diapédesis, penetrando finalmente en el intersticio tisular. Los granulocitos juegan un papel importante durante la inflamación aguda y debido a su rápida respuesta fagocítica constituyen una de las primeras líneas de defensa frente a microorganismos invasores. Poseen un núcleo lobulado y se subdividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos, según la avidez de sus gránulos citoplasmáticos por tinciones neutras, ácidas o básicas respectivamente. Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en los tejidos deben ser atribuidos a la liberación del contenido de sus gránulos, en el fagolisosoma o en el medio extracelular. Los neutrófilos emplean péptidos antimicrobianos y proteínas, los cuales destruyen microorganismos invasores (Tizard, 2009). En los resultados del trabajo los leucocitos circulantes de conejos muestran una expresión de las proteínas de degranulación cuando son estimulados por el extracto completo de *S. aucheniae* a 1 y 12 horas de exposición *in vitro*; esto indica que los leucocitos son estimulados por diferentes moléculas que inducen las transducciones de señales que desencadenen la degranulación. En la metodología empleada se ha utilizado los leucocitos circulantes de la sangre de conejos, lo que constituyen una mezcla de diferentes células blancas, como linfocitos (50-63%), monocitos (0%), neutrófilos (39-43%), basófilos (0%) y eosinófilos (0-5%) permitiendo que muchos de ellos reconozcan las moléculas que estimulen su degranulación según Giusti *et al* (2012).

La Mieloperoxidasa (MPO) es una hemoproteína que se almacena en los gránulos azurófilos primarios principalmente de los neutrófilos PMNs representando el 5% de la proteína total y es una de las proteínas más abundantes de estas células; también se ha encontrado en los monocitos (~1% de la proteína total) y en los macrófagos tisulares (Daugherty y col., 1994). Durante la activación y degranulación celular, la MPO es liberada tanto en vacuolas fagocíticas como directamente al espacio extracelular. Es bien conocido y aceptado que el nivel de actividad de la MPO está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado; por lo que la medición de esta actividad enzimática ha sido considerada un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio y también es considerada como un indicativo de estrés oxidativo (Moutaery, 2005; Cheng *et al* 2006; Koksel *et al* 2006).

La N-acetil-glucosaminidasa derivado de la glucosamina que a su vez es derivado de la glucosa (NAG) se trata de una enzima lisosómica del tipo de las hidrolasas que se sintetiza en las células tubulares proximales renales, que por su alto peso molecular (entre 130-140 kDa) no se filtra por el glomérulo y se excreta por la orina. Está implicado en la degradación de los mucopolisacáridos y glicoproteínas (Manjon 2010). Las infecciones crónicas y las infecciones agudas repetidas estimulan en los individuos la producción de anticuerpos. También hay importante producción de anticuerpos en enfermedades no infecciosas muchas de las cuales son de origen autoinmune. En ambos casos la coexistencia de los antígenos y sus anticuerpos propicia la formación de complejos autoinmunes, tanto fijos en los sitios de lesión como solubles en la circulación. Los complejos inmunes usualmente son fijadores de complemento, de tal manera que su activación puede ocurrir tanto localmente como en la circulación. Los complejos inmunes solubles son altamente patogénicos debido a su propensión a depositarse en estructuras sujetas a alto tráfico o intercambio de sangre o plasma como las membranas basales de los endotelios vasculares, los glomérulos renales, los plexos coroideos y las articulaciones.

El depósito de los complejos inmunes en los glomérulos es particularmente importante porque al ser el riñón el principal órgano desintoxicador de la sangre, mantiene permanentemente una abundante circulación sanguínea. Los complejos inmunes depositados en las estructuras mencionadas inician la activación del complemento y los efectos biológicos ya señalados, incluyendo la lisis celular. El aumento de la permeabilidad vascular facilita la salida de las células, en tanto que la actividad quimiotáctica de C5a promueve la acumulación de leucocitos en el sitio de lesión. Los leucocitos polimorfonucleares, mientras ejercen su actividad fagocítica, liberan al medio circundante su contenido granular que incluye hidrolasas ácidas y neutras, así como otros componentes tóxicos. Las hidrolasas actuando en forma indiscriminada, lesionan tejidos afectados, comprometiendo su función (Rojas, 2006).

Un aumento en la excreción urinaria de NAG se observa en daño tubular por varias causas, incluyendo la nefrotoxicidad por drogas, el rechazo del trasplante renal y la nefritis túbulointersticial; también la NAG se ha encontrado elevada en la orina de pacientes humanos con varios tipos de enfermedad glomerular, uropatía obstructiva y nefroesclerosis (Borrego, 2003), y por la razón conocida de daños en órganos detoxificadores por parte del extracto de *Sarcocystis aucheniae* (Sam 1998) se tomó en cuenta en el presente experimento.

Para medir estos productos de la degranulación leucocitaria se uso la técnica de Western Blotting (Inmunoelectrotransferencia) ya que es capaz de determinar la masa molecular relativa de una proteína y explorar su comportamiento dentro de una mezcla compleja de proteínas (Roitt 2008).

Con el objetivo de identificar la proteína de interés en la mezcla proteica separada por electroforesis se utilizan anticuerpos. Dado que los anticuerpos son proteínas relativamente grandes, no pueden atravesar la matriz del gel con facilidad; la solución a este problema es transferir el gel sobre una membrana con carga positiva para que atrape las proteínas cargadas y las inmovilice en su superficie (Roitt 2008). La transferencia puede demostrarse entonces con sondas de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra la proteína de interés. La unión del anticuerpo se detecta empleando anticuerpos secundarios anti-Ig conjugados con peroxidasa de rábanos, seguido de la aplicación de un sustrato adecuado para la enzima. Es obvio que el procedimiento no funciona con antígenos que sufren desnaturalización irreversible por el dodecilsulfato sódico (detergente), y es mejor utilizar antisueros policlonales para la inmunotransferencia con el fin de aumentar la oportunidad de incluir anticuerpos contra cualquier epítipo que sobreviva al procedimiento de desnaturalización; un número sorprendente lo hace (Roitt 2008).

VI. CONCLUSIONES

- El extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* a dosis de 0.5, 1, 50, 500, 1000 ng/100µl a 1 y 12 horas de inoculado sobre leucocitos de conejo, es altamente citotóxico para éstos y se observa que se induce a su degranulación. evidenciada por la detección y cuantificación relativa de las enzimas leucocitarias Mieloperoxidasa y Glucosaminidasa.
- El extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* a concentraciones mayores de 5 ng /100µl es tóxico para los leucocitos circulantes de conejo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abu-Soud H.; Hazen S. 2000.** Nitrid oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. J Biol Chem; 275: 5425-5430.
2. **Acha, P.; B. Szyfres. 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. p 84-87. Editorial .Washington DC.
3. **Alderman MH, Melcher L, Drayer DE, Reinderberg MM. 1983.** Increased excretion of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in essential hypertension and its decline with antihypertensive therapy. N Engl J Med.; 309:1213–1217.
4. **Alva, J.; Rojas M.; Núñez A. 1980.** Decomisos por parasitosis y su importancia económica en alpacas (Lama pacos).Rev. Inv. Pec. (IVITA) 5: 61-63.
5. **Alva J, Bazalar H, Guerrero D, Núñez L. 1981.** Observaciones del ciclo de vida del Sarcocystis aucheniae de alpacas (Lama pacos). Res. V Cong. Per. Microb. Y Parasit. Arequipa.
6. **Atías, N. 1995.** Parasitología clínica. 3ª ed. P 489-492. Editorial Mediterráneo. Santiago.
7. **Ayala C. 1999.** Estudio detallado de la ocurrencia de Sarcocystis en el altiplano Boliviano. En: Progress in South American Camelids Research. p 181-185. The European Association for Animal Production. Göttingen, Germany.
8. **Babior BM. 1978.** Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. England J. Med. 298:659-668.
9. **Barriga O. 2002.** Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Santiago: Germinal. 247p.
10. **Bentz, B.G.; Dirikolu, L.; Carter, W.G.; Saville, W.; Williams, N.M.; Bernard, W.V.; Wulff-Strobel, C.; Baker, C.B.; McCrillis, S.; Reed, S.; Harkins, J.D.;**

- Granstrom, D.E.; Tobin, T.2000.** Diaclazuril and equine protozoal myeloencephalitis (EPM): a clinical report. Equine Veterinary Education. 12(4):195-200.
11. **Borrego, J. 2003.** Nefrología .4° ed. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia-Medellín.Pag 74-75.
 12. **Briggs M, Foreyt W. 1985.** Sarcocystis in Cattle. Continuing Education 6, (7):3.
 13. **Carrasco L. 2007.** Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen en el fluido oviductal de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral. Tesis Doctoral Veterinaria. Murcia-España: Univ. De Murcia. 135 p.
 14. **Carrigan, M.J. 1986.** An outbreak of sarcocistiosis in dairy cattle. Aust Vet J. 63:22-24.
 15. **Castro J. 1974.** Sarcocystis aucheniae en llamas (Lama glama). Rev. Inv. Pec. IVITA, UNMSM, 3:91-92
 16. **Castro E, Sam R, Lopez T, Gonzáles A, Silvia M. 2004.** Evaluación de la edad como factor de riesgo de seropositividad a Sarcocystis sp. En alpacas. Rev Inv Vet, Perú.15: 83-86.
 17. **Clubb SL, Frenkel JK. 1992.** Sarcocystis falcatula of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease en psittacine birds. J. Parasitol. 78:116-124.
 18. **Concha, S. 1999.** Strategical plan of communication in marketing for the open consumption of alpaca's meat in Arequipa-Perú. En: Progress in South American Camelids Research. p 122-131. The European Association for Animal Production. Göttingen, Germany.
 19. **CONCYTEC. 1988.** Seminario-Taller sobre producción, procesamiento, transformación y consumo de Carne de Camélidos domésticos. P 48. Dic. Puno.
 20. **Cordero del Campillo, Rojas M, Fernández M, Sánchez M, Rodríguez S, López I. 1999.** Parasitología Veterinaria. España: Editorial Mc. Graw-Hill. 968 p.
 21. **Cornejo R, Chávez A, Leyva V, Falcón N, Panez S, Ticona D. 2007.** Relación entre el tamaño de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* y su viabilidad en *Canis familiaris* Rev. investig. vet. Perú v.18 n.1 Lima ene. /jun.

22. **Cheng, H., Xia B., Zhang, L., Zhou, F., Zhang, Y.X., Ye, M., Hu, Z.G., Li, J., Wang, Z.L., Li, C., Guo, Q.S. 2006 .** Matrine improves 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Pharmacological Research*, 53: 202-208.
23. **Darling D, Morgan S. 1993.** Cultivo de células animales. Editorial Acribia S.A. 18 va. Edición. España. Pág 41-45.
24. **Dubey JP. 1976.** A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cats and dogs. *J. am. Vet. Med. Assoc.* 169: 1061-1078.
25. **Dubey J, Leek R, Fayer R. 1986.** Prevalence transmission and pathogenicity of *Sarcocystis gigantean*. *J. Am. Vet. Med.* 2:151-153.
26. **Dubey JP, Speer CA, Fayer R. 1989.** *Sarcocystis* of animals and man. CRC Press. Boca Ratón, FL, USA. 215p.
27. **Dubey JP, Davis SW, Speer CA, Bowman DD, De Lanuta A, Granstrom DE, Topper MJ, Hamir AN, Cummings JF, Suter MM. 1991a.** *Sarcocystis neurona* n. Sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Parasitol.* 77: 212-218
28. **Dubey JP, Speer CA. 1991b.** *Sarcocystis canis* n.sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), the etiologic agent of generalized coccidiosis in dogs. *J. Parasitol.* 77: 525-7.
29. **Dubey JP, Hamir AN. 2000.** Immunohistochemical confirmation of *Sarcocystis neurona* infections in raccoons, mink, cat, shunk and pony. *J. Parasitol.* 86:1150-2.
30. **Dubey, J.; Fritz, D.; Lindsay, D; Shen, S.; Kwok, O.; Thompson, K. 2001.** Diklazuril preventive therapy of gamma interferon knockout mice fed *Sarcocystis neurona* sporocysts. *Vet. Parasitol:* 94(20): 257-264
31. **Esterl ,W M ; Brandt , U ; Anderka , O : Kieb , S ; Ridinger , K ; Plenikowski , M . 2008.** *Biología: Fundamentos para Medicina y ciencia de la Vida.* Barcelona. Reverte. 113 p.
32. **Fayer R, Johnson AJ. 1973.** Development of *Sarcocystis fusiformis* in calves infect with sporocysts from dogs. *J. Parasitol.* 59:1135-1137.
33. **Fayer, R. 2004.** *Sarcocystis spp.* in human infections. *Clin. Microbiol. Rev.* Oct; 17(4):894-902.

34. **Foote C.; Gozne T.; Lehrer R.1983:** Assesment of chlorination by human neutrophils .Nature; 301:715-726.
35. **Frenkel JK. 2000.** Sarcosporidiosis. En: Hunter's tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. Ed. G. Thomas Strickland. 5th edition. Philadelphia: Edit. W.B. 707-709 p.
36. **Garner, M.M.; Barr, B.C.; Packham, A.E.; Marsh, A.E., Burekhuntington, K.A.; Wilson, R.K.; Dubey, J.P. 1997.** Fatal Hepatic Sarcocystosis in two polar bears (*Ursus maritimus*). J. Parasitol. 83:523-526.
37. **Gasbarre L, Suter P, Fayer R. 1984.** Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. Am. J. Vet. Res. 45: 1592-1596.
38. **Giusti M, Lacchini R, Farina OH, Rule R. Parámetros bioquímicos, hematológicos y productividad de conejos alimentados con dietas normo e hipoproteica. 2012.** Acta Bioquim Clín Latinoam 2012; 46 (2): 213-9
39. **Gómez E. 2007.** Manual de Inmunología Veterinaria. España. Editorial Pearson Education S.A. 46-48p.
40. **Gorman TR, Alcaino HE, Muñoz H, Cunazza C. 1984.** Sarcocystis in guanaco (lama guanicoe) and effect of temperature on its viability. Vet Parasitol. 15:95-101.
41. **Godoy R. 2007.** Saneamiento y detoxificación de la carne de llama (Lama glama) infectada con *Sarcocystis aucheniae* mediante cocción, horneado, fritura y congelado. Rev. Inv. Vet. Perú. 18(1):51-56
42. **Guerrero C, Hernández J, Alva J. 1967.** Sarcocystis en alpacas. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM 21:69-73.
43. **Guerrero C, Leguia G.1987.**Enfermedades infecciosas y parasitarias de alpacas .Rev Camélidos Sudamericanos 4: 32-82.
44. **Gunn H, Frher J. 1992.** Incidence of Sarcocystisin skeletal muscle of horses. Vet. Parasitol. 42(1-2): 3340.
45. **Hamir A, Dubey JP. 2001.** Miocarditis and encephalitis associated with *Sarcocystis neuona* infections in raccoons (*Procyon lotor*). J. Parasitol. 95: 335- 340.

46. **Hiepe F, Hiepe T, Hlinak R, Jungmann R, Horsch R, Weidner B. 1979.** Experimentelle Infektion des Menschen und Von Tieraffen (*Ureopithecus allitrichus*) mit Sarcosporidien-Zysten Von Rind und schwein. Arch. Exp. Veterinaarmed. 33: 819
47. **Hiepe F , Lietzke L, Scheibner G , Jungmann R , Hiepe T , Montag T. 1981.** Untersuchungen sur toxischen wirkung von extrakten aus *Sarcocystis ovifelis* – Macrozysten auf kanichen. Mh. Vet. Med. 36:908-910.
48. **Hilali M, Nassar A. 1992.** Camel (*Camel dromedarius*) and sheep (*Ovis aries*) meat as a source of dog infection with some coccidian parasites. Vet. Parasitol. 43(1-2): 37-43.
49. **Hinostroza, S. 2012.** Expresión de citoquinas pro inflamatorias de leucocitos de alpaca (*Vicugna pacos*) inducidos por el extracto de macroquistes de *Sarcocystis* *aucheniae*. Tesis de Médico Veterinario .Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 50 p.
50. **Hung, A. 2006.** Avance de la Investigación en Sarcocistiosis de Camélidos Sudamericanos. Foro. Auditorio de la Dirección Regional Agraria de Puno. ON Line: <http://tumi.lamolina.edu.pe/estrategia/descarga/archivo1.pdf#search=%2FORO%3A%20AVANCE%20DE%20LA%20INVESTIGACI%C3%93N%0EN%20SARCOCISTIOSIS%20%22>. (23/09/06)
51. **Jensen R, Alexander F, Dahlgren. 1986.** Eosinophilic myositis and muscular sarcocystiosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. J. Vet. Res. 47 (3): 587-593.
52. **Johnston ID, Jones NF, Scoble JE, Yuen CT, Price RG. 1983.** The diagnostic value of urinary enzyme measurements in hypertension. *Clin Chim Acta*. 133(3):317–325.
53. **Kettle A., Winterbourn C. 1997.** Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production .Redox. Rep. 3(1). 3-15 pp
54. **Khan S, P, Fong D. 1991.** Sarcocystis in Caribou (*Rangifer tarandus terraenora*) in Newfoundland. Southeast Asian j. Trop. Med. Public Health. Suppl. 22: 142-143.
55. **Klebanoff, S.J. and Clark, R.A. 1978.** The Neutrophil: Function and Clinical Disorders. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 810 p.

56. **Koksel, O., Ozdulger, A., Tamer, L., Cinel, L., Ercil, M., Degirmenci, U., Unlu, S., Kanik, A. (2006).** Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. 19: 90-95.
57. **Kopf SR, Nahmod VE. 1988.** N-acetil-glucosaminidasa: una enzima sensible a alteraciones renales funcionales y morfológicas. Rev .Inv .Med. 48(2): 215-216.
58. **Kudi A C, Aganga A. 1991.** Prevalence of Sarcocystis species in sheep and goats in Northern Nigeria. Rev. Elev. Med. Pays Trop. 44(1): 59-60.
59. **Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of de head of Bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
60. **La Perle KM, Silverio F, Anderson DE, Blomme EA. 1999.** Dalmeni disease in an alpaca (*Lama pacos*): Sarcocystosis, eosinophilic, myositis and abortion. J. Comp. Pathol. 121: 287-293.
61. **Leguía, G. 1987.** Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de las Alpacas. CICC UNMSM-IVITA. 4. oct. P. 38-43.
62. **Leguía G, Guerrero C, Sam R, Rosadio R. 1988.** Patología de Sarcocystis aucheniae en alpacas infectadas experimentalmente. X Con. Pan. Cien. Vet. Lima – Perú.
63. **Leguía G, Guerrero C, Sam R, Chávez A. 1989a.** Infección experimental de perros y gatos con microquistes y macroquistes de sarcocystosis de alpacas. MV Rev. Cienc. Vet. 5(3):10-13.
64. **Leguía G, Clavo N. 1989b.** Sarcocistiosis o “triquina”. Boletín técnico N° 7- CICC UNMSM IVITA agosto-Lima-Perú. p. 5-19.
65. **Leguía G, Guerrero C, Chávez A, Arévalo F, Sam R. 1990.** Estudio de la sarcocistiosis en alpacas. Avances sobre investigación en salud animal Camélidos Sudamericanos. UNMSM: Bol. Div. N° 23. p 43-46.
66. **Leguía, G. 1991.** The epidemiology and economic impact of llama parasites. Parasit Today, 7:54–56.
67. **Leguía G, Casas E. 1999.** Enfermedades Parasitarias y Atlas Parasitológico de Camélidos Sudamericanos. Edit. De Mar. Lima, Perú. 190 p.

68. **Levine, N. 1986.** The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa) species. *Parasitology today*, (7): 54-56.
69. **Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L. 1995.** Antiprotozoan drugs. In: ADAMS, H.R. *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 7th ed., Iowa State University: Ames, p.955- 983.
70. **Lindsay, D.; Dubey, J.; Kennedy, T. 2000.** Determination of the activity of ponazuril against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Veterinary parasitology*. 92: 165-169.
71. **Lindsay DS, Rosypal C, Spencer JA, Cheadle MA, Zajac AM, Rupprecht CH, Dubey JP, Blagburn B. 2001.** Prevalence of agglutinating antibodies to *Sarcocystis neurona* in raccoons, *Procyon lotor*, from the United States. *Vet. Parasitol.* 100: 131-134.
72. **López M, Gonzáles A. 1992.** Estandarización del Sistema Inmunoenzimático de detección de Anticuerpos de alpaca (*Lama pacos*) Utilizando Proteína A Conjugada con Peroxidasa. *Theorema*, UNMSM, Lima.2:44-45.
73. **Mandour AM. 1969.** The toxicity of *sarcocystis*. *J.Med. Microbiol.* 2(3):361-363.
74. **Manjon M. 2010.** Estudio de N-acetil beta-2 glucosaminidasa y otros marcadores de daño renal en la nefroangioesclerosis hipertensiva. Tesis Doctoral de Medicina. Granada -España: Univ. de Granada. 256 p.
75. **Marquez L.; Dunford H; Van Wart H .1990.** Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem*; 265: 5666-5670.
76. **Martínez, J.; Pérez, J.; Cámara, S.; Millán, Y.; Borge, C. 1999.** Patología de los pequeños rumiantes en imágenes (IV). Enfermedades de los adultos (enfermedades parasitarias). Universidad de Córdoba. On line: http://www.colvet.es/infovet/dic99/ciencias_v/articulo1.htm
77. **Mehlhorn. 1993.** *Parasitología veterinaria*. Bogotá: Grosslatros. 195p.
78. **Melo D, Rojas N, Neira E. 1992.** *Sarcocystis* en músculo de alpaca. II estudio en el microscopio electrónico de las formas celulares en los macroquistes. *Teorema UNMSM* 2:27

79. **Melo D. 1974.** Estudio del *Sarcocystis aucheniae* Brump, 1913 (Protozoa: Sarcocystidae) con el microscopio electrónico. Tesis para obtener el título de Biólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 60 p.
80. **Meyer BR, Fischbein A , Rosenman K , et al . 1984.** Increased urinary enzyme excretion in workers exposed to nephrotoxic chemicals. *Am J Med* ; 76 : 989
81. **Moutaery, AA. 2005.** Proglumide attenuates experimental colitis in rats. *Experimental an Toxicologic Pathology*, 56: 369-379.
82. **Nauseef WM, Malech HL .1986.** Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood*: 67: 1504-1507.
83. **Nakamura T, Saito M, Shibata Y, Itagaki H. 1999.** Induction of tumor necrosis factor α and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*. *Vet. Parasitol.* 38 (4):236-243
84. **Oblitas F , Pedrozo R , Wittwer F , Bohmald H , Ackerman L. 1998 .** Valores sanguíneos en alpacas (*Lama pacos*) reintroducidas en el sur de Chile. *J .Vet. Mex.* 29(4), 411-414.
85. **Perovic M. 1991.** Epidemiology and diagnosis of *Sarcocystis*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. Suppl.* 22: 135-7.
86. **Quiroga D, Lombardero O, Zorrilla R. 1969.** *Sarcocystis tilopi n. sp.* en guanacos (*Lama guanicoe*) de la República de Argentina. *Gaceta Veterinaria.* 31:67-70.
87. **Quiroz H. 2005 .**Parasitología y Enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Mexico. Editorial Limusa S.A. 49-50.
88. **Radostis O, Gay C, Blodd D, Keneth W, Cliff H. 2002.** Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino, equino. España.: Mc Graw – Hill. 2215p
89. **Ramírez A, Franco E, Pezo D, Garcia W. 1998.** Diagnóstico y control de las enfermedades en camélidos sudamericanos. *Publ. Téc. Fac. Med. Vet. Lima* 34: 70-74.
90. **Ramírez A, Sam R, Ameghino E, Pezo D. 1995.** Método de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Sarcosystis aucheniae*. *Teorema.* 6: 64-65.

91. **Reina M. 2003.** Métodos en biología celular: ELISA. Última actualización: 15/09/2003. Extraído el 22 de octubre, 2005 de <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm#Tipos%20de%20ensayos%20>.
92. **Renart J, Reiser J, Stark GR. 1979.** Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (7): 3116–3120.
93. **Rodríguez, M; y Vergel, N. 2004.** “Evaluación de actividad enzimática de desgranulación leucocitaria en un modelo de inflamación aguda”. Tesis Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
94. **Roitt I. 2008.** Inmunología. Editorial Panamericana. Argentina. 11° edición. 121-3p.
95. **Rojas E. 2006.** Inmunología (de memoria).3ª ed. México DF: Panamericana .253p.
96. **Rojas M. 1990.** Parasitismo de los Rumiantes Domésticos. Terapia, Prevención y Modelos para su aprendizaje. Perú: Edit. Mijosa. 383p.
97. **Rojas M, Lobato I, Montalvo M. 1993.** Fauna parasitaria de camélidos sudamericanos y ovinos en pequeños rebaños mixtos familiares. *Rev. Pec. Inv. (IVITA)* 6: 22-27.
98. **Rojas W. 2004.** Inmunología. Editorial Corporación para investigaciones biológicas. Colombia. 13° edición. 12p.
99. **Sam R. 1988.** *Sarcocystis aucheniae*: Caracterización parcial de componentes antigénicos y patología clínica experimental en alpacas. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 118 p.
100. **Sam R.; Verastegui M.; Mallqui V.; Ramirez A. 1996.** Detección de anticuerpos contra *Sarcocystis aucheniae* en alpacas mediante electroinmunotransferencia. En: I Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca-Perú.Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 118 p.
101. **Sam R, Mansilla I, Morales C, Ramírez A. 1998.** Efecto tóxico de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* en ratones, cobayos y conejos. *Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú)* 1998 (No Extraordinario); 9 (2): 11-18
102. **Schnieder T, Kanp FJ, Drommer W, Thiel W, Rommel M. 1984.** Fine structure and development of *Sarcocystis aucheniae* in llamas. *Z. Parasitenkd.* 70: 451- 458.

103. **Soulsby EJ. 1987.** Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7 ed. México: Interamericana.823p.
104. **Tadros W.; Laarman J. 1982.** Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia, Adv. Parasitol. 20: 293.
105. **Tello R. 2000.** Coccidiosis. Diagnóstico. 39: 118-119
106. **Tenter, A. M. 1995.** Current research on Sarcocystis species of domestic animals. Int. J. Parasitol., 25:1311- 1330.
107. **Tizard, I. 2009.** Inmunología veterinaria. 8ª ed. México: Mc Graw – Hill pp. 29-31.
108. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979 .** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76 (9): 4350–4354.
109. **Uggla A.; Buxton D. 1990.** Immune responses against toxoplasma and Sarcocystis infection in ruminants: diagnosis and prospect for vaccination. Rev. Sc. Tech. 1990 9 (2): 441-619.
110. **Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A. M.; Jennings, F. W. 1996.** Veterinary Parasitology. 2da ed. Ed Blackwell Science. Oxford. 307 p.
111. **Urquhart G, Armour J, Duncan J, Jenmings F. 2001.** Parasitología Veterinaria. 2 ed. Zaragoza: Acribia. 355p.
112. **Vilca, M. 1991.** Producción, Tecnología e Higiene de la Carne. En: Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. FAO. Santiago, Chile. 429 p.
113. **White, S. 1998.** Sarcocystosis: A Parasite Endemic to Andean Alpacas.mVol III, N° 1. The Alpaca Registry Journal; en: www.alpacaregistry.net/journal/win98j-12.html
114. **Whiting, P.H.,Thomson,AW. and Simpson,J.G.1986.**Cyclosporine and renal enzyme excretion.Clin. Nephrol.,25 (Supl.1),S100-S104